

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
des Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

**Inverse PPAR β/δ Agonisten:
Rekrutierung von Co-Repressoren und
Mechanismen der transkriptionellen Repression**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nathalie Legrand

geboren in Hermeskeil

Marburg (Lahn), 2019

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>

Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 09.10.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin.

Dekan:	Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent:	PD Dr. Till Adhikary
1. Korreferentin:	Prof. Dr. Wibke Diederich

Zusammenfassung

Der Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptor β/δ (PPAR β/δ) bindet als Klasse II Kernrezeptor mit seinem obligatorischen Heterodimerisierungspartner RXR an PPAR-responsive Elemente (PPREs) der DNA. Im unligierten Zustand übt PPAR β/δ durch die Rekrutierung von NCoR/SMRT-Komplexen eine basale Repression auf die Transkription seiner kanonischen Zielgene aus. Die Bindung eines Agonisten führt zur Dissoziation dieser Co-Repressoren und ermöglicht die Rekrutierung von Co-Aktivatoren, was letztlich in einer Aktivierung der Transkription resultiert. Synthetische inverse Agonisten bewirken hingegen eine verstärkte Repression, die eine Aktivierung der Transkription des Zielgens *ANGPTL4* durch verschiedene Stimuli auf dominante Weise unterdrückt. Die TGF β -vermittelte Induktion der *ANGPTL4*-Transkription ist ein zentraler fördernder Schritt im Metastasierungsprozess von Brustkrebszellen. Aufgrund ihrer Eigenschaften, diese transkriptionelle Aktivierung von *ANGPTL4* dominant zu unterbinden, sind inverse PPAR β/δ Agonisten vielversprechende Kandidaten in der Wirkstoffentwicklung zur Behandlung von Neoplasien. Der zugrundeliegende Mechanismus war weitgehend unverstanden, und Experimente unserer Arbeitsgruppe wiesen zunächst darauf hin, dass der dominant-repressive Effekt nicht durch NCoR/SMRT-Komplexe und die Deacetylase-Aktivität ihrer HDAC3-Untereinheit vermittelt wird.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Aufklärung des Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten. Dabei diente das besonders stark durch PPAR β/δ Liganden regulierte Zielgen *ANGPTL4* als Modell-Locus.

In ChIP-qPCR Experimenten konnte gezeigt werden, dass der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 den Ablauf der Transkription von PPAR β/δ Zielgenen am Schritt der Initiation bzw. Reinitiation beeinträchtigt. Es wurde eine verminderte Rekrutierung aktivierender Untereinheiten des Mediator-Komplexes (MED1, MED26 und MED13L) sowie des generellen Transkriptionsfaktors (GTF) TFIIB und der RNA-Polymerase II zum *ANGPTL4* Promotor festgestellt. Die Rekrutierung anderer GTFs wie TFIIA wird hingegen nicht beeinflusst. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Mediator-Komplex die Rekrutierung von TFIIB unterstützt und dass sowohl der Mediator-Komplex als auch TFIIB für die Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum Präinitiationskomplex erforderlich sind. Somit könnte letztlich die beeinträchtigte Rekrutierung von aktivierenden Mediator-Untereinheiten (oder des gesamten Mediator-Komplexes) für die Beeinträchtigung der Rekrutierung von TFIIB und der RNA-Polymerase II ursächlich sein.

Zur Identifikation von Co-Repressoren, die in Anwesenheit eines inversen Agonisten von PPAR β/δ rekrutiert werden, wurden ChIP-massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Komponenten der NCoR/SMRT-Komplexe wurden als spezifische Interaktoren bei Bindung des inversen Agonisten PT-S264 detektiert. Unter den PT-S264 abhängigen Interaktoren fanden sich darüber hinaus keine anderen bekannten Co-Repressoren. Die verstärkte Rekrutierung

von NCoR/SMRT-Komplexkomponenten durch PPAR β/δ bei Bindung des inversen Agonisten konnte in ChIP-qPCR Experimenten bestätigt werden.

Um weitere Erkenntnisse über die transkriptionelle Regulation durch PPAR β/δ und insbesondere die Bindung der in Anwesenheit von PT-S264 rekrutierten Co-Repressoren zu gewinnen, wurde ein funktioneller Screen von 80 PPAR β/δ -Mutanten durchgeführt. MDA-MB-231-*luc2* *PPARD* KO Zellen wurden retroviral mit mutierten *PPARD* cDNAs transduziert und auf eine Beeinträchtigung der transkriptionellen Regulation des Zielgens *ANGPTL4* untersucht. Dabei wurden, neben der verstärkten Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264, auch die basale Repression und die Aktivierung durch den PPAR β/δ Agonisten L165,041 betrachtet. Mehrere in diesem funktionellen Screen identifizierte Mutanten zeigten einen Verlust der basalen Repression und waren von besonderem Wert für die weitere Untersuchung des Mechanismus der Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten. So zeigte sich im Basalzustand gegenüber den mit Wildtyp PPAR β/δ rekonstituierten Zellen eine verminderte Anwesenheit von NCoR/SMRT-Komplexkomponenten an PPRES von PPAR β/δ Zielgenen, die mit einer vermehrten Rekrutierung der RNA-Polymerase II an die Promotoren einherging. Durch den inversen Agonisten PT-S264 konnte die Rekrutierung von NCoR/SMRT-Komplexkomponenten und die daraus resultierende verminderte Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum Promotor in den Mutanten wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sowohl die basale Repression als auch die Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten von NCoR/SMRT-Komplexen vermittelt werden. Die Rolle der enzymatischen Untereinheit der NCoR/SMRT-Komplexe HDAC3 bei der Repression wurde durch den Einsatz von Deacetylase-Inhibitoren überprüft. Dabei verhielten sich die basale Repression und die Repression durch den inversen Agonisten größtenteils insensitive gegenüber der Inhibition von Deacetylase-Aktivität.

Somit deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass NCoR/SMRT-Komplexe die transkriptionelle Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten über Deacetylase-abhängige und Deacetylase-unabhängige Mechanismen vermitteln. Die Unterdrückung der Rekrutierung von aktivierenden Mediator-Untereinheiten ist wahrscheinlich ursächlich für das Ausbleiben der Rekrutierung von TFIIB und der RNA-Polymerase II zum Transkriptionsstart. Somit wird letztlich die Transkription am Schritt der Initiation bzw. Reinitiation gestört.

Abschließend wurden zwei Hypothesen aufgestellt, die interessante Fragestellungen für zukünftige Projekte aufwerfen:

- I. NCoR bzw. SMRT verhindern die Bildung eines aktiven Initiationskomplexes durch die direkte Inhibition von Acetyltransferase-Aktivität oder durch andere deacetylase-unabhängige Mechanismen.
- II. NCoR bzw. SMRT verhindern Kontakte zwischen regulatorischen Elementen und dem Promotor durch die Regulation von Chromatin-Interaktionen. Angesichts der Stabilisierung von Cohesin-Komplexen durch Acetylierungen könnte dies in direktem Zusammenhang mit Hypothese I stehen.

Summary

The class II nuclear receptor peroxisome proliferator activated receptor β/δ (PPAR β/δ) binds with its obligate heterodimerization partner RXR to PPAR responsive elements (PPREs) of the DNA. In the unliganded state, PPAR β/δ exerts basal repression on the transcription of its canonical target genes by recruiting NCoR/SMRT complexes. Binding of an agonist leads to the dissociation of these co-repressors and allows for co-activator recruitment, which results in activation of transcription. On the other hand, synthetic inverse agonists provoke reinforced repression, which prevents transcriptional induction of the target gene *ANGPTL4* by different stimuli in a dominant manner. TGF β mediated induction of *ANGPTL4* transcription is a central promoting step in metastasis of breast cancer cells. Based on their ability to suppress this transcriptional activation of *ANGPTL4*, PPAR β/δ inverse agonists are promising candidates for the development of antineoplastic agents. The underlying mechanism of repression was largely unknown, and experiments of our group initially indicated, that the dominant repressive effect is not mediated by NCoR/SMRT complexes and the deacetylase activity of its HDAC3 subunit.

The present thesis addresses the elucidation of the mechanism of transcriptional repression by PPAR β/δ inverse agonists. *ANGPTL4* regulation by PPAR β/δ ligands is particularly strong, and this gene was therefore used as model locus.

ChIP-qPCR experiments showed that the PPAR β/δ inverse agonist PT-S264 impairs transcription at the initiation or reinitiation step, respectively. Diminished recruitment of activating subunits of the Mediator complex (MED1, MED26 and MED13L) as well as the general transcription factor (GTF) TFIIB and RNA polymerase II to the *ANGPTL4* promotor was detected. In contrast, recruitment of other GTFs such as TFIIA was not affected. It is known from literature, that the Mediator complex supports recruitment of TFIIB and that both, Mediator and TFIIB, are necessary for the recruitment of RNA polymerase II to the preinitiation complex. Therefore, the impaired recruitment of activating Mediator subunits (or the entire Mediator complex) could be causative for the impairment of TFIIB and RNA polymerase II recruitment.

To identify co-repressors, which are recruited to PPAR β/δ in the presence of inverse agonists, ChIP mass spectrometry analyses were performed. Components of NCoR/SMRT complexes were detected as specific interactors upon binding of PT-S264. Among the PT-S264 dependent interactors no other known co-repressors were identified. The increased recruitment of NCoR/SMRT complex components by PPAR β/δ upon binding of the inverse agonist was validated in ChIP-qPCR experiments.

To obtain further insights into transcriptional regulation by PPAR β/δ and particularly the binding of co-repressors recruited in the presence of PT-S264, a functional screen of 80 PPAR β/δ mutants was performed. MDA-MB-231-*luc2* *PPARD* KO cells were retrovirally transduced with mutant *PPARD* cDNAs and tested for an impairment of transcriptional regulation of the target

gene *ANGPTL4*. Besides reinforced repression by the PPAR β/δ inverse agonist PT-S264, basal repression in the absence of synthetic ligands and activation by the PPAR β/δ agonist L165,041 were analysed. Several mutants identified in the functional screen showed a loss of basal repression and were of value for further investigation of the mechanisms. Compared to cells transduced with wildtype PPAR β/δ , reduced presence of NCoR/SMRT complex components at the PPRES of PPAR β/δ target genes was detected in the basal state, which was accompanied by increased recruitment of RNA polymerase II at their promoters. In cells expressing the mutants, recruitment of NCoR/SMRT complex components and the resulting diminished recruitment of RNA polymerase II to the promoter was restored by the PPAR β/δ inverse agonist PT-S264. These findings suggest that both basal repression by unliganded PPAR β/δ and repression by the PPAR β/δ inverse agonist are mediated by NCoR/SMRT complexes. The role of the HDAC3 subunit of NCoR/SMRT complexes in repression was tested by the use of deacetylase inhibitors. Basal repression as well as repression by the inverse agonist were largely insensitive to inhibition of deacetylase activity.

Taken together, the results of the present thesis indicate that NCoR/SMRT complexes mediate the transcriptional repression by PPAR β/δ inverse agonists by both deacetylase-dependent and deacetylase-independent mechanisms. Prevention of recruitment of activating Mediator subunits is probably causative for diminished TFIIB and RNA polymerase II recruitment to the transcription start site. Consequently, transcription is impaired at the initiation or reinitiation step. In conclusion, two hypotheses were proposed, which raise interesting questions for future approaches:

- I. NCoR and/ or SMRT prevent the formation of an active initiation complex by direct inhibition of acetyltransferase activity or through other mechanisms which do not rely on deacetylase activity.
- II. NCoR and/ or SMRT prevent contacts between regulatory elements and the promotor by regulating chromatin interactions. Given the stabilization of cohesin complexes by acetylation, this could be directly linked to hypothesis I.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptor β/δ	1
1.1.1 Einordnung in die Kernrezeptor-Superfamilie	1
1.1.2 Expressionsmuster und physiologische Funktion von PPAR β/δ	2
1.1.3 Rolle von PPAR β/δ in der Pathologie und Tumorigenese	3
1.1.4 Domänen von PPAR β/δ und deren Funktionen	4
1.1.5 DNA-Bindung der PPARs und Dimerisierung mit RXR	6
1.1.6 Liganden-Bindung der PPARs und Konformation der Helix 12	8
1.2 Regulation der Transkription durch PPARβ/δ	9
1.2.1 Basale Repression durch den unligierten PPAR β/δ Rezeptor	10
1.2.2 Aktivierung der Zielgen-Transkription bei Agonisten-Bindung	10
1.2.3 Repression der Transkription durch inverse Agonisten	11
1.2.4 Das PPAR β/δ -Zielgen <i>ANGPTL4</i>	12
1.3 NCoR- und SMRT-Komplexe	14
1.3.1 NCoR und SMRT	14
1.3.2 Aufbau des NCoR- bzw. SMRT-Kernkomplexes	16
1.3.3 Interaktoren und Funktionen der NCoR- bzw. SMRT-Komplexe	17
1.4 Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II (mRNA)	20
1.4.1 Formation des Präinitiationskomplexes (PIC)	20
1.4.2 Initiation der Transkription	24
1.4.3 Elongation	27
1.4.4 Termination	30
1.4.5 Reinitiation, Gen-Looping und Recycling der Polymerase	31
1.5 Der Mediator-Komplex	33
1.5.1 Aufbau und Struktur des Mediator-Komplexes	33

1.5.2	Funktionen des Mediator-Komplexes in der Transkription	36
1.6	Projektskizze	40
1.6.1	Projekt-Hintergrund	40
1.6.2	Zielsetzung der Arbeit	40
2	MATERIALIEN	42
2.1	Geräte	42
2.2	Verbrauchsmaterialien	44
2.3	Reagenzien	46
2.3.1	PPAR-Liganden, sonstige Stoffe & Chemikalien.....	46
2.3.2	Puffer und Lösungen	47
2.3.3	Medien und sonstiges für die Bakterien- & Zellkultur	51
2.3.4	Enzyme & Molekulargewichtsstandards.....	52
2.3.5	Kits	52
2.4	Antikörper & Nukleinsäuren	54
2.4.1	Antikörper	54
2.4.2	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung.....	55
2.4.3	Plasmide.....	58
2.4.4	crRNAs für CRISPR/Cas9	59
2.5	Organismen	60
2.5.1	Zelllinien	60
2.5.2	Bakterienstämme	60
2.6	Software und Datenbanken	61
3	METHODEN	62
3.1	Klonierungen	62
3.1.1	Klonierungsstrategien.....	62
3.1.1.1	PPAR β/δ -NCoR1/SMRT-Fusionskonstrukte	62
3.1.1.2	Dominant-negatives NCoR1 (dnNCoR1)	63
3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	65
3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	65

3.1.4	PCR-Mutagenese (<i>Site-directed Mutagenesis</i>).....	66
3.1.5	Restriktionsverdau.....	68
3.1.6	Desphosphorylierung von geschnittenen Plasmiden	69
3.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	70
3.1.8	Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA.....	70
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	71
3.1.10	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	71
3.1.11	Kolonie-PCR.....	73
3.1.12	Plasmidpräparationen	73
3.1.12.1	Mini-Präparationen	73
3.1.12.2	Midi-Präparationen	75
3.1.13	Sequenzierung von Plasmiden.....	75
3.2	Biochemische und molekularbiologische Methoden	76
3.2.1	RNA-Isolation	76
3.2.2	Reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR)	76
3.2.3	Messung der Proteinkonzentration.....	78
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	79
3.3	Immunologische Methoden	81
3.3.1	Western Blot.....	81
3.3.2	Chromatin-Immunpräzipitation qPCR (ChIP-qPCR)	82
3.3.3	Interaktom-Analysen mittels RIME-Protokoll von Active Motif	84
3.4	Zellbiologische Methoden	85
3.4.1	Verwendete Zelllinien	85
3.4.2	Kulturbedingungen	86
3.4.3	Passagieren von Zellen	86
3.4.4	Aussäen von Zellen für die Behandlung.....	87
3.4.5	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	88
3.5	Transfektionstechniken und CRISPR/Cas9	89
3.5.1	CRISPR/Cas9 zur Generierung von <i>NCOR1 Knockout</i> Zellen	89
3.5.2	Polyethylenimin (PEI) - Transfektion	92

3.5.3	Virenproduktion in Phoenix-eco (ϕ NX-eco) Zellen.....	93
3.5.4	Retrovirale Infektion	94
4	ERGEBNISSE	95
4.1	Modell-Locus und Auswahl von geeigneten Zellsystemen.....	95
4.2	Auswirkungen auf Schritte des Transkriptionszyklus.....	96
4.2.1	Eingrenzung des betroffenen Schritts im Transkriptionszyklus.....	96
4.2.2	Untersuchung der Phosphorylierung von Serin 2 und 5 der CTD	99
4.2.3	Überprüfung der Rekrutierung genereller Transkriptionsfaktoren	100
4.2.4	Überprüfung der Rekrutierung von Mediator-Untereinheiten	101
4.3	Identifizierung beteiligter Co-Repressoren.....	103
4.3.1	Interaktom-Analysen mittels RIME (ChIP-MS)	103
4.3.2	Validierung der Rekrutierung von NCoR/SMRT-Komplexen.....	105
4.4	Charakterisierung des <i>PPARD KO</i> Klons und Rekonstitution.....	107
4.4.1	Charakterisierung des MDA-MB231- <i>luc2 PPARD KO</i> Klons 2B3.....	107
4.4.2	Sequenzierung des MDA-MB231- <i>luc2 PPARD KO</i> Klons 2B3	109
4.4.3	Rekonstitution des MDA-MB231- <i>luc2 PPARD KO</i> Klons 2B3	110
4.5	Funktioneller Screen von PPARβ/δ Mutanten	112
4.5.1	Experimentelles Vorgehen und die Messgröße log ₂ (Ratio).....	112
4.5.2	Übersicht über die Ergebnisse des funktionellen Screens	114
4.5.3	Deletionsmutanten Δ AF1, Δ AF2 und Δ L-Box+AF2.....	120
4.5.4	Punktmutationen in der L-Box und der Helix 12.....	122
4.5.5	Beeinträchtigung aller drei transkriptionellen Regulationstypen.....	124
4.5.6	Beeinträchtigung der Liganden-vermittelten transkript. Regulation.....	124
4.5.7	Beeinträchtigung der Repression durch den inversen Agonisten	124
4.5.8	Beeinträchtigung der basalen Repression	124
4.6	Charakterisierung von PPARβ/δ Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression	125
4.6.1	Auswirkungen auf die transkriptionelle Regulation von <i>ANGPTL4</i>	125
4.6.2	Auswirkungen auf die Rekrutierung von Co-Repressoren	127
4.6.3	Auswirkungen auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II	130

4.7 Überprüfung der Abhängigkeit von der Deactylase-Aktivität	131
4.8 Ansätze zum Nachweis eines funktionellen Zusammenhangs mit NCoR/SMRT-Komplexen.....	134
4.8.1 CRISPR/Cas9-vermittelter <i>Knockout</i> von <i>NCOR1</i>	134
4.8.2 Expression eines dominant-negativen NCoR-Fragments (dnNCoR)	136
4.8.3 Expression von PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionsproteinen	137
5 DISKUSSION UND AUSBLICK	140
5.1 Die Zelllinien MDA-MB231-<i>luc2</i> und Caki-1 bieten geeignete Zellsysteme für die geplanten Untersuchungen.....	140
5.2 Auswirkungen auf Schritte des Transkriptionszyklus.....	141
5.2.1 Der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 vermindert die Bindung der RNA-Polymerase II am Transkriptionsstart.....	141
5.2.2 Die Phosphorylierung der Serine 2 und 5 der RNA-Polymerase II RPB1 CTD- <i>Repeats</i> scheint nicht beeinträchtigt zu sein	142
5.2.3 PT-S264 unterdrückt die Rekrutierung von TFIIB zum <i>Scaffold</i> -Komplex	143
5.2.4 PT-S264 verhindert die Rekrutierung aktivierender Mediator-Untereinheiten.....	144
5.3 Identifizierung beteiligter Co-Repressoren.....	145
5.3.1 Untereinheiten der NCoR/SMRT-Komplexe wurden als spezifische Interaktoren in Anwesenheit des inversen Agonisten detektiert.....	145
5.3.2 Der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 führt zur verstärkten Rekrutierung von Untereinheiten der NCoR/SMRT-Komplexe an PPRES	147
5.4 Charakterisierung des <i>PPARD KO</i> Klons und Rekonstitution.....	148
5.4.1 Der <i>Knockout</i> von PPAR β/δ konnte im Klon MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 auf mehreren Ebenen nachgewiesen werden	148
5.4.2 Mutationen im <i>PPARD</i> Gen des MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 Klons führen zu einem verfrühten Stopp-Codon	149
5.4.3 Der MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 <i>PPARD KO</i> Klon konnte durch retrovirale Infektion erfolgreich rekonstituiert werden	150
5.5 Funktioneller Screen von PPARβ/δ Mutanten	151
5.5.1 Technische Probleme und Optimierungsansätze für den Screen	151
5.5.2 Kritische Beurteilung des funktionellen Screens	152

5.5.3	Die Deletion der AF1 führt zur verminderten basalen Repression, die Deletion der AF2 hat einen Verlust der Aktivierung zur Folge.....	153
5.5.4	Diskussion zu den Punktmutanten in L-Box und Helix 12.....	154
5.5.5	Zehn Mutanten zeigen einen Verlust aller drei untersuchten transkriptionellen Regulationstypen.....	160
5.5.6	Die Mutation H413W beeinträchtigt die Ligandenbindung	162
5.5.7	Die Mutanten V254A, R321A, R321K und I327A zeigen eine verminderte Repression durch den inversen Agonisten.....	165
5.5.8	Die Mutanten K421A, K421A-K422A und T427I zeigen einen Verlust der basalen Repression und verstärkte Repression durch PT-S264	167
5.5.9	Fazit zum funktionellen Screen von PPAR β/δ Mutanten	170
5.6	Charakterisierung von PPARβ/δ Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression	173
5.6.1	Der Verlust der basalen Repression führt zu einer verstärkten Repression durch den inversen Agonisten	173
5.6.2	Die Rekrutierung von NCoR, SMRT und HDAC3 wird durch den inversen Agonisten wiederhergestellt	173
5.6.3	Die Senkung der RNA-Polymerase II Rekrutierung wird durch den inversen Agonisten wiederhergestellt	174
5.7	Überprüfung der Abhängigkeit von der Deactylase-Aktivität	175
5.8	Ansätze zum Nachweis eines funktionellen Zusammenhangs mit NCoR/SMRT-Komplexen.....	177
5.8.1	Mittels CRISPR/Cas9 konnte kein <i>Knockout</i> von <i>NCOR1</i> in MDA-MB231- <i>luc2</i> Zellen generiert werden.....	177
5.8.2	Das dominant-negative NCoR1-Fragment (dnNCoR1) konnte nicht exprimiert werden.....	178
5.8.3	Die PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionsproteine konnten in den MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 <i>PPARD</i> KO Zellen kaum exprimiert werden	178
5.9	Ausblick	179
6	VERZEICHNISSE	183
6.1	Literaturverzeichnis	183
6.2	Abbildungsverzeichnis	205

6.3	Tabellenverzeichnis	208
6.4	Abkürzungsverzeichnis	209
7	ANHANG	216
7.1	Ergänzende Abbildungen	216
7.2	Lebenslauf	220
7.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer	221
7.4	Danksagung	222
7.5	Veröffentlichungen	223
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	224

1 Einleitung

1.1 Der Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptor β/δ

Der Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptor β/δ (PPAR β/δ) und die Regulation seiner Zielgene wurde bereits in der eigenen Masterarbeit ^[155] untersucht. Ein Teil der nachfolgenden einleitenden Abschnitte über den PPAR β/δ Kernrezeptor wurde in überarbeiteter und ergänzter Fassung übernommen.

1.1.1 Einordnung in die Kernrezeptor-Superfamilie

Kernrezeptoren sind Liganden-regulierbare Transkriptionsfaktoren, die an spezifische Erkennungssequenzen in der DNA (sogenannte *response elements*, REs) binden, um die Transkription ihrer Zielgene zu regulieren. Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptor-Superfamilie können anhand ihres Verhaltens im unligierten Zustand, ihrer Dimerisierungs-Eigenschaften und der Organisation ihrer Erkennungssequenzen in der DNA in drei Gruppen eingeteilt werden (siehe Tabelle 1).

Die Steroidrezeptoren bilden die erste Klasse der Kernrezeptoren. Im unligierten Zustand liegen Steroidrezeptoren komplexiert an *Heat-Shock*-Proteine vor. Die Bindung eines Liganden führt zur Dissoziation der *Heat-Shock*-Proteine und ermöglicht die Bildung von Homodimeren. Im Kern binden die Homodimere präferentiell in einer *Head-to-head* Orientierung (Abbildung 1) an invertierte Hexanukleotid-*Repeats* (*inverted repeats*, IR) und aktivieren ihre Zielgene ^[1, 19].

Klasse	unligiert	Dimerisierung	DNA-Bindung	Beispiele
Klasse I: Steroidrezeptoren	Zytoplasma/ Kern, an <i>Heat-Shock</i> -Proteinen	Homodimere	<i>inverted repeat</i> (IR) <i>Head-to-head</i>	PR, ER, GR, MR, AR
Klasse II: Thyroid/ Retinoid	Kern, DNA-Bindung; Repression	Heterodimere mit RXR	<i>direct repeat</i> (DR) <i>Head-to-tail</i>	TR, VDR, RAR, PPAR
Klasse III: <i>Orphan</i> Rezeptoren		Monomere, Dimere	Hexamer-Sequenz, IR, DR	ERR, HNF4, Rev-Erb

Tabelle 1: Klassen der Kernrezeptor-Superfamilie

Kernrezeptoren der Klasse II (Thyroid/Retinoid-Familie) binden hingegen bereits im unligierten Zustand als Heterodimere mit ihrem obligatorischen Dimerisierungspartner RXR (*retinoid X receptor*) an die DNA. Aufgrund der Organisation ihrer Erkennungssequenzen als direkte (gleich

orientierte) Hexanukleotid-*Repeats*, die durch 1-5 Basenpaare voneinander getrennt sind (*direct repeats*, DR1-5 Elemente), erfolgt ihre Bindung in einer *Head-to-tail* Orientierung. Im unligierten Zustand sind Kernrezeptoren der Klasse II, zu denen auch die PPARs gehören, in der Regel mit Co-Repressoren assoziiert und reprimieren die Transkription ihrer Zielgene. Durch die Bindung von Agonisten kommt es zur Dissoziation der Co-Repressoren und zur Rekrutierung von Co-Aktivatoren, die mit transkriptioneller Aktivierung einhergeht ^[1, 19].

Die dritte Klasse von Kernrezeptoren ist weniger gut charakterisiert und besteht zum Großteil aus Rezeptoren, für die bisher keine endogenen Liganden beschrieben wurden. Daher wird diese Klasse auch als *Orphan Receptors* (Waisen) bezeichnet. Sie können als Monomere an Hexanukleotid-Sequenzen oder als Dimere an zusammengesetzte Elemente wie *direct* oder *inverted repeats* binden ^[1, 19].

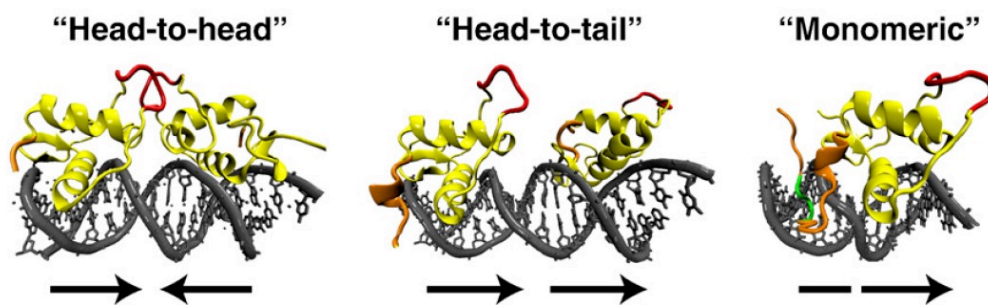


Abbildung 1: DNA-Bindungstypen der Kernrezeptor-Superfamilie. Kernrezeptoren der Klasse I binden präferentiell in einer *Head-to-head* Orientierung an *inverted repeats*. Klasse II Kernrezeptoren binden mit ihrem Dimerisierungspartner RXR in einer *Head-to-tail* Orientierung an *direct repeats*. Rezeptoren der Klasse III binden präferentiell als Monomere an Hexamer-Sequenzen. Aus Aagaard *et al.* 2011 ^[1].

1.1.2 Expressionsmuster und physiologische Funktion von PPAR β/δ

Der Peroxisomen-Proliferator-Aktivierte Rezeptor β/δ (PPAR β/δ) gehört zu den Kernrezeptoren der Klasse II und reguliert als Liganden-regulierbarer Transkriptionsfaktor seine Zielgene. PPAR β/δ (NR1C2) zeigt große strukturelle Homologien zu den anderen bekannten Subtypen der PPAR-Familie PPAR α (NR1C2) und PPAR γ (NR1C3) ^[211]. Die drei Kernrezeptoren weisen allerdings teils unterschiedliche gewebsspezifische Expressionsmuster und biologische Funktionen auf ^[183]. PPAR α ist vor allem in Geweben mit sehr aktiver β -Oxidation wie dem braunen Fettgewebe, der Leber, dem Herzen, den Nieren, der Skelettmuskulatur und dem Dickdarm, exprimiert. Auch PPAR γ zeigt eine Expression in der Leber, im Herzen und im braunen Fettgewebe, allerdings darüber hinaus im weißen Fettgewebe, im Kolon und im Lymphgewebe ^[183]. PPAR β/δ zeigt das breiteste Expressionsmuster und ist ubiquitär exprimiert. Girroir *et al.* untersuchten 2008 ^[88] die PPAR β/δ Proteinexpression in verschiedenen Geweben der Maus und be-

obachteten die stärkste Expression in Kolon, Dünndarm, Leber, Keratinozyten, Haut und Niere. Doch auch in Hirn, Herz, Lunge und Hoden konnten hohe Expressionen gemessen werden. PPAR β/δ ist neben dem Fettsäure- und Lipidmetabolismus auch an zahlreichen weiteren physiologischen Prozessen beteiligt. So konnten Lee *et al.* 2006 ^[152] beispielsweise eine Rolle des Kernrezeptors bei der Regulation des Glucose-Metabolismus und der Insulin-Sensitivität zeigen. Weiterhin übernimmt PPAR β/δ wichtige Funktionen in der Zelldifferenzierung und -proliferation sowie dem Zellüberleben ^[61, 192, 198, 287] und trägt in entscheidendem Maße zu Wundheilungsprozessen bei ^[62, 182, 187, 270].

1.1.3 Rolle von PPAR β/δ in der Pathologie und Tumorigenese

Eine Überexpression von PPAR β/δ wird mit Hautkrankheiten wie Akne vulgaris oder der von starken Entzündungsreaktionen begleiteten Psoriasis in Verbindung gebracht ^[186, 243, 301]. Die Kernrezeptoren der PPAR-Familie sind außerdem in mehreren Aspekten der Atherosklerose involviert ^[66]. Die Aktivierung von PPAR β/δ durch Agonisten hat eine anti-inflammatorische Wirkung in zahlreichen entzündlichen Krankheitsbildern, sodass PPAR β/δ ein interessantes therapeutisches Ziel für diese Erkrankungen darstellt ^[204].

Eine entscheidende Rolle von PPAR β/δ in onkogenen Signalwegen und in der Tumorigenese wird kontrovers diskutiert ^[8, 193, 191, 227, 228, 286]. Die Literaturlage ist teils widersprüchlich, sodass bisher kein Konsens über eine eher tumorfördernde oder eher tumorunterdrückende Funktion von PPAR β/δ besteht. Einerseits finden sich Hinweise auf eine protumorigene Wirkung von PPAR β/δ durch seine anti-apoptotischen Eigenschaften und aufgrund einer gesteigerten Zellproliferation ^[227]. Andererseits wirkt PPAR β/δ der Tumorigenese entgegen, indem es die terminale Differenzierung fördert und pro-inflammatorische Signale inhibiert ^[227]. Müller-Brüsselbach *et al.* befassten sich 2007 ^[194] mit der Tumorangiogenese und nutzten ein syngenes Mausmodell, in dem *Ppard* Wildtyp Tumore in *Ppard Knockout* Mäusen (d.h. in einer Umgebung von *Ppard Knockout* Stroma) untersucht wurden. Dabei konnten sie zeigen, dass die Struktur des Mikrogefäßsystems stark beeinträchtigt war, was einen verminderten Blutfluss zur Folge hatte. Es fanden sich Hinweise darauf, dass PPAR β/δ eine wichtige Funktion bei der Feinabstimmung von Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen des Tumorstromas übernimmt. Weiterhin konnten mehrere Studien einen Zusammenhang von PPAR β/δ mit der Polarisation von Makrophagen, insbesondere Tumor-assoziierten Makrophagen, zeigen ^[9, 252, 286].

Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse von Studien zur Rolle von PPAR β/δ in onkogenen Entwicklungen könnte die Komplexität seiner Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen sein. Ein Tumor kann nicht isoliert betrachtet werden, da auch die Zellen des Tumorstromas wie zum Beispiel Endothelzellen oder Immunzellen in entscheidendem Maße

fördernd oder aber supprimierend auf die Tumorigenese und Tumorpromotion einwirken. Insbesondere in fortgeschrittenen Tumorstadien scheint die Rolle von PPAR β/δ an Komplexität zu gewinnen. Neben dem Expressionslevel von PPAR β/δ nimmt auch die Verfügbarkeit von Liganden Einfluss auf die letztendlich ausgeübte Regulation der Zielgene (Anhang Abb. Z1) ^[191, 252].

1.1.4 Domänen von PPAR β/δ und deren Funktionen

Die Proteinstruktur von PPAR β/δ lässt sich, wie für alle Mitglieder der Kernrezeptor-Superfamilie, grob in vier Domänen einteilen: N-terminale Domäne (NTD), DNA-bindende Domäne (DBD), *Hinge*-Domäne und Liganden-bindende Domäne (LBD) (Abbildung 2) ^[1].

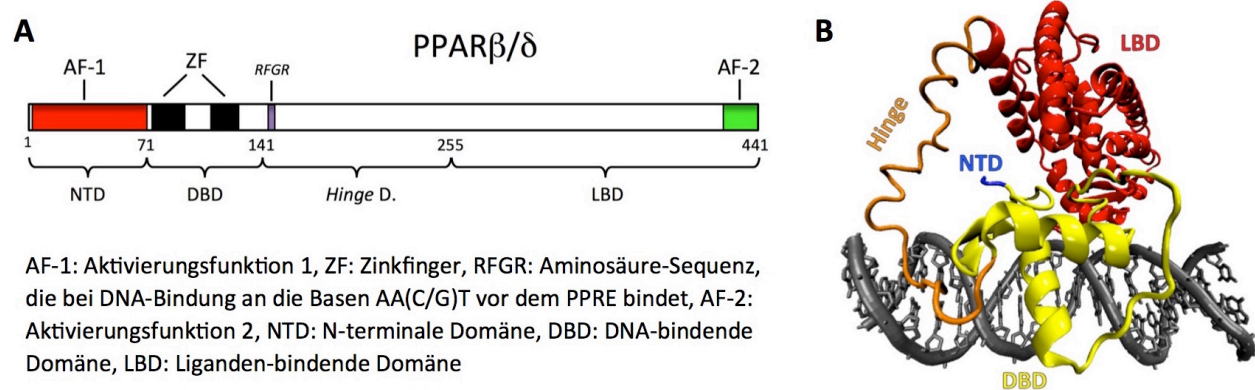


Abbildung 2: Proteinstruktur von PPAR β/δ . A) Schematische Darstellung der Domänen und Motive von PPAR β/δ . Die Proteinstruktur kann in vier Domänen unterteilt werden: variable N-terminale Domäne (NTD), DNA-bindende Domäne (DBD), flexible *Hinge*-Domäne und Liganden-bindende Domäne (LBD). B) Kristallstruktur von DNA-gebundenem PPAR γ (DBD, *Hinge* und LBD). Aus Aagaard *et al.* 2011 ^[1], RCSB Protein Data Bank Code (PDB ID): 3DZY.

N-terminale Domäne (variable Domäne)

Die nicht-konservierte N-terminale Domäne (NTD) ist zwischen den Kernrezeptoren und auch unter den verschiedenen PPAR-Subtypen sowohl in der Länge als auch in der Sequenz sehr variabel ^[294]. Dies legt eine rezeptorspezifische Funktion der NTD nahe und weist auf eine entscheidende Rolle für die Subtyp-, Zelltyp- und Gen-spezifischen Funktionen der Kernrezeptoren hin. Die NTD enthält die Aktivierungsfunktion 1 (AF-1), die zu den intrinsisch ungeordneten Aktivierungsdomänen zählt. In Lösung liegt die NTD bzw. AF-1 unstrukturiert vor, doch es gibt Hinweise darauf, dass sie abhängig von inter- und intramolekularen Interaktionen je nach Art der Interaktion verschiedene höher geordnete Sekundärstrukturen einnimmt ^[1, 294]. Werman *et al.* zeigten 1997 ^[300] für PPAR γ (und Juge-Aubry 1999 für PPAR α ^[127]) eine von der Liganden-Bindung unabhängige transkriptionelle Aktivität der AF-1, die auch bei anderen Kernrezeptoren beobachtet wurde ^[294].

DNA-Bindungsdomäne (DBD)

Die DNA-bindende Domäne ist unter allen Kernrezeptoren hochkonserviert und hochstrukturiert. Sie trägt zwei Zinkfinger-Motive vom Typ C4 (Zinkfinger mit vier zinkbindenden Cysteinen) (Quelle: UniProt), jeweils gefolgt von einer α -Helix, die die DNA-Bindung vermitteln ^[1]. In Kapitel 1.1.5 wird die DNA-Bindung der PPARs genauer beschrieben. Wie Chandra *et al.* 2008 ^[43] anhand einer Kristallstruktur des DNA-gebundenen PPAR γ -RXR α -Dimers zeigen konnten, bietet die DBD außerdem eine kleine Interaktionsoberfläche für die Dimerisierung mit dem für die DNA-Bindung der PPARs obligatorischen Heterodimerisierungspartner RXR. Den Abschluss des Kerns der DBD bildet die zwischen allen Kernrezeptoren hochkonservierte GM Sequenz (Glycin, Methionin).

Hinge-Domäne

Der Hinge-Domäne wurde lange Zeit vor allem eine Funktion als flexibler Linker zwischen DBD und LBD zugesprochen, der eine variable Positionierung der beiden Domänen relativ zueinander ermöglicht und damit die DNA-Bindung und die Rezeptor-Dimerisierung vereinfacht. Sie enthält direkt zu Beginn am Übergang von der DBD (angrenzend an die GM-Sequenz) die sogenannte C-terminale Extension (CTE). Diese ist zwar (wie die gesamte Hinge-Domäne) zwischen den einzelnen Kernrezeptor-Subfamilien sehr variabel ^[1], beim Vergleich der einzelnen PPAR-Subtypen innerhalb der Subfamilie fällt allerdings eine Konservierung der ersten elf Aminosäuren auf (GMSHNAIRFGRMP, Quellen: Ensembl, Clustal X). Hsu *et al.* zeigten 1998 ^[105], dass die CTE durch Interaktionen mit flankierenden Sequenzen des *Response Elements* zur Spezifität und Polarität der DNA-Bindung von PPARs beiträgt.

Ligandenbindungsdomäne (LBD)

Die Liganden-bindende Domäne ist nach der DBD die am zweitstärksten konservierte Domäne der Kernrezeptoren. Bei PPAR β/δ besteht sie aus 13 α -Helices und vier β -Faltblatt-Strukturen ^[305, 324], die zusammen die für Kernrezeptoren typische kugelförmige Tertiärstruktur, das „dreischichtige antiparallele α -helikale Sandwich“, bilden ^[1, 34] (Abbildung 3). Zwischen dem ersten β -Faltblatt und Helix 3 tragen die PPARs eine zusätzliche Helix, die in anderen Kernrezeptoren nicht zu finden ist ^[324]. Um der Nomenklatur der übrigen Sekundärstrukturelemente basierend auf der Kristallstruktur der RXR LBD ^[34] für eine bessere Vergleichbarkeit treu zu bleiben, wird diese als Helix H2' bezeichnet ^[210, 305]. Wie bereits Uppenberg *et al.* 1998 anhand der Kristallstruktur von PPAR γ feststellten, bilden Helix 10 und Helix 11 bei den PPARs eine durchgängige Helix ^[284, 324].

Neben der Ligandenbindungstasche bietet die LBD auch Interaktionsoberflächen für Co-Aktivatoren und Co-Repressoren sowie den Großteil der Dimerisierungsoberfläche für den Dimerisierungspartner RXR (insbesondere Helix 10) ^[87]. Am C-Terminus der LBD befindet sich die Ligan-

denabhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF-2, Helix 12). Diese ist im Gegensatz zur AF-1 im N-Terminus hochkonserviert und hochstrukturiert. Die Bindung von Liganden induziert eine Konformationsänderung der Helix 12. Dadurch wird je nach Ligandentyp und Positionierung der Helix die Rekrutierung von Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren ermöglicht ^[1, 324] (Kapitel 1.1.6).

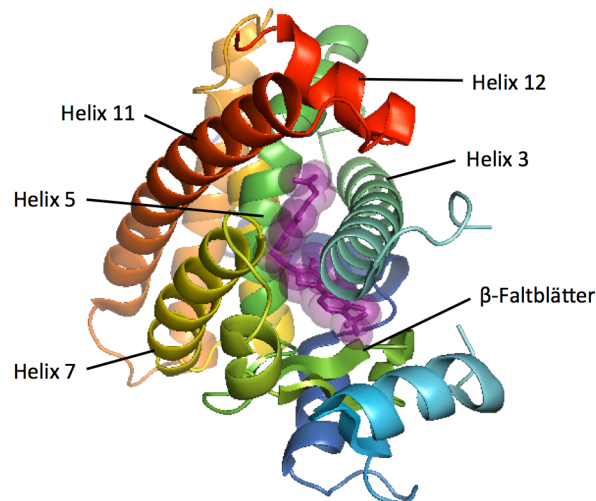


Abbildung 3: Kristallstruktur der PPAR β/δ -LBD mit dem Agonisten GW0742. Die Helices 3, 5, 7 und 11 bilden gemeinsam mit der β -Faltblatt Struktur die Liganden-Bindungstasche, in die der Agonist GW0742 (lila) bindet. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Sekundärstrukturbereiche ist die LBD von PPAR β/δ vom N-Terminus in blau zum C-Terminus in rot dargestellt. Struktur: PDB ID: 3TKM, Batista *et al.* 2012 ^[22], dargestellt in Pymol; Annotation der Sekundärstrukturelemente gemäß Zoete *et al.* 2007 ^[324].

1.1.5 DNA-Bindung der PPARs und Dimerisierung mit RXR

Die DNA-Bindung der PPARs erfolgt an spezifischen Erkennungssequenzen, den *PPAR Response Elements* (PPREs), und erfordert eine Heterodimerisierung mit dem Kernrezeptor Retinoid X Rezeptor (RXR) (Abbildung 4C) ^[140]. PPREs zeichnen sich durch die aus *Direct Repeats* bestehende Konsensussequenz 5'-AACT AGGTCA A AGGTCA-3' mit einem *Spacer*-Nukleotid aus und sind somit DR1-Elemente ^[110]. Die ehemals von IJpenberg *et al.* veröffentlichte Konsensus-Sequenz konnte für PPAR β/δ im Jahr 2011 von Adhikary *et al.* ^[7] durch genomweite ChIP-Seq Untersuchungen angepasst werden (5'-AAGT AGGGGA A AGGTCA-3').

Wie bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt, trägt die DNA-Bindungsdomäne der PPARs zwei Zinkfinger-Motive vom Typ C4 (Quelle: UniProt), jeweils gefolgt von einer α -Helix, die die DNA-Bindung vermitteln ^[1]. Dabei interagiert die erste α -Helix in sequenzabhängiger Weise innerhalb der großen Furche der DNA mit den Basen des *Response Elements* (Abbildung 4A-C). Die zweite Helix nimmt eine lotrechte Position ein und stabilisiert die Struktur der DNA-Bindungsdomäne durch unspezifische Interaktionen mit dem Rückgrat der DNA. Im Gegensatz zur ersten Helix bildet sie allerdings keine basenspezifischen Kontakte zum *Response Element* aus ^[1].

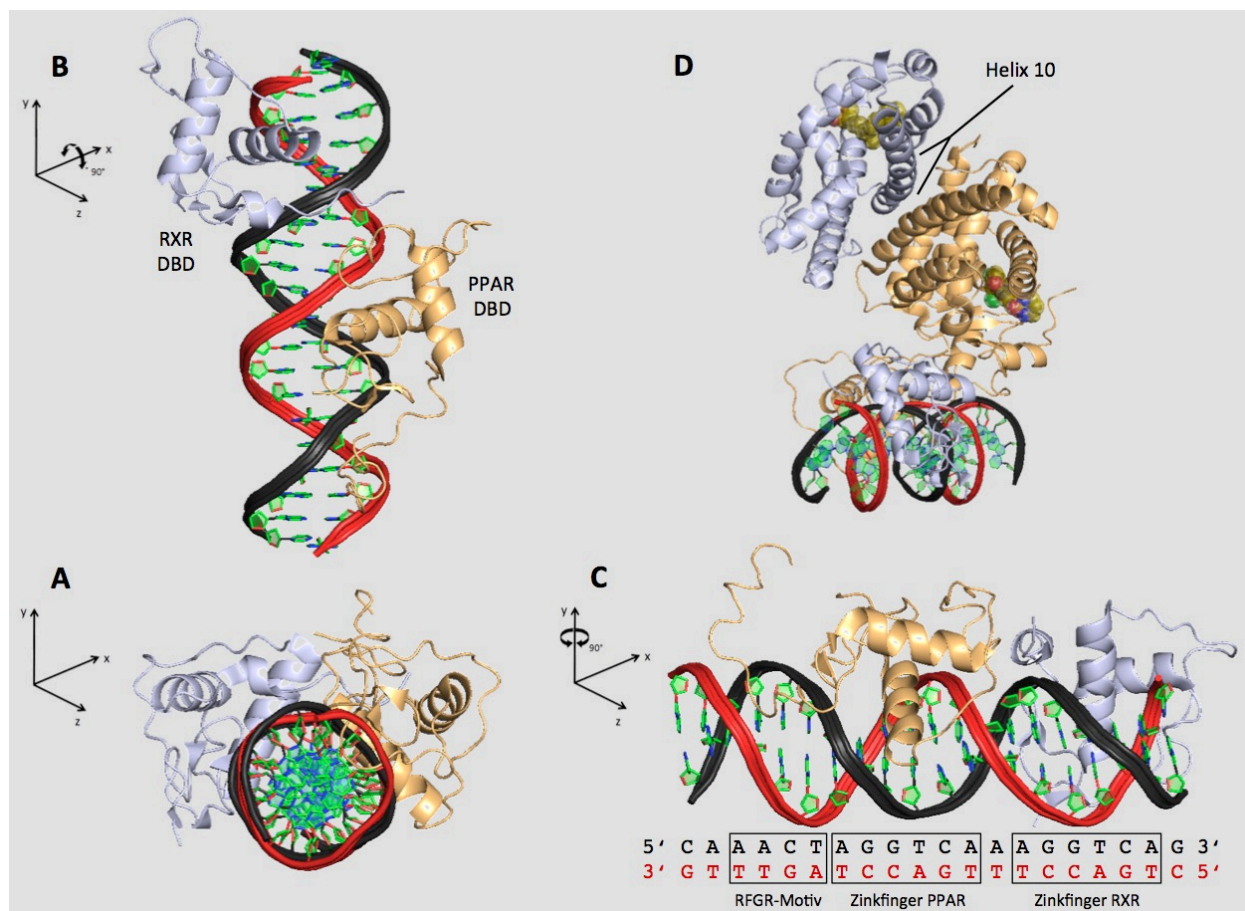


Abbildung 4: DNA-Bindung der PPARs mit ihrem Dimerisierungspartner RXR. A) Kristallstruktur der DNA-gebundenen DBDs von PPAR γ (beige) und RXR α (grau) vom Querschnitt der DNA gesehen. B) Kristallstruktur der DBDs in der Draufsicht. Jeweils eine Helix der DBDs bindet eine große Furche der DNA. C) Kristallstruktur der DBDs von der Seite. Die Sequenzen geben die Basen der DNA-Stränge wieder. PPAR γ bindet mit der DBD an die 5' *Repeat*-Sequenz, während die RXR-DBD an die 3' Hälfte des PPRE bindet. Die vier Aminosäuren „RFGR“ der CTE in der PPAR γ Hinge-Domäne treten mit der 5' flankierenden Sequenz AACT in Kontakt (kleine DNA-Furche). D) Kristallstruktur des DNA-gebundenen PPAR γ :RXR α -Dimers mit ihren Liganden BVT13 und *cis*-9 Retinsäure (gelb) in einem Blickwinkel, der die Interaktionsoberfläche der LBDs gut erkennen lässt. PDB ID: 3DZU, Chandra *et al.* 2008 ^[43].

Das PPAR:RXR-Dimer bindet in einer *Head-to-tail* Orientierung an die DNA ^[1]. Dabei binden die Zinkfinger und α -Helices der PPAR-DBD die 5' liegende Sequenz des *Repeats*, während RXR an die 3' liegende Hälfte des PPRES bindet. Bei der Betrachtung der Kristallstruktur des DNA-gebundenen PPAR γ :RXR α -Dimers (Abbildung 4) fällt auf, dass die vier Aminosäuren „RFGR“ der CTE in der *Hinge*-Domäne des PPARs mit der 5' flankierenden Sequenz AACT in Kontakt treten (kleine Furche der DNA) ^[43]. Rohs *et al.* untersuchten 2009 ^[242] den Einfluss der DNA-Form auf die Ausbildung von Protein-DNA-Kontakten. Wie sie zeigen konnten, treten Arginine im Vergleich zu anderen Aminosäuren besonders häufig mit der kleinen Furche der DNA in Kontakt (vor allem wenn diese verengt ist). Bei vielen Kernrezeptoren enthält die CTE Argininreiche Motive, die die DNA-Bindung durch Interaktionen mit der kleinen Furche der DNA

unterstützen können ^[1]. Durch die hohe Variabilität der CTE zwischen verschiedenen Kernrezeptoren könnten solche Kontakte zur DNA-Bindungsselektivität beitragen.

Die Dimerisierungsoberfläche zwischen den PPARs und RXR wird insbesondere von den Helices 9 und 10 gebildet ^[87] (Abbildung 4D). Jedoch bieten auch die DNA-Bindungsdomänen, wie bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt, eine kleine Interaktionsoberfläche zwischen den Dimerisierungspartnern ^[43].

1.1.6 Liganden-Bindung der PPARs und Konformation der Helix 12

Die Ligandenbindungsdomäne der PPARs bildet eine hydrophobe Y-förmige Bindetasche aus. Aufgrund der Hydrophobizität ihrer Oberfläche gehören insbesondere Lipide und Lipid-Derivate zu den Liganden der PPARs, was im Einklang mit ihrer physiologischen Rolle als Lipidsensoren steht ^[24]. Ihr im Vergleich zu anderen Kernrezeptoren mit ca. 1300 Å³ besonders hohes Volumen ^[210, 305] ermöglicht eine Interaktion mit einer Vielfalt von strukturell verschiedenen, natürlichen sowie synthetischen Liganden. Dennoch führen Unterschiede in einzelnen Aminosäuren zwischen den PPAR-Subtypen und eine im Bereich der AF-2 Helix verengte Bindetasche bei PPARβ/δ zu einer gewissen Selektivität von endogenen Liganden und ermöglicht die Herstellung spezifischer synthetischer Liganden ^[306].

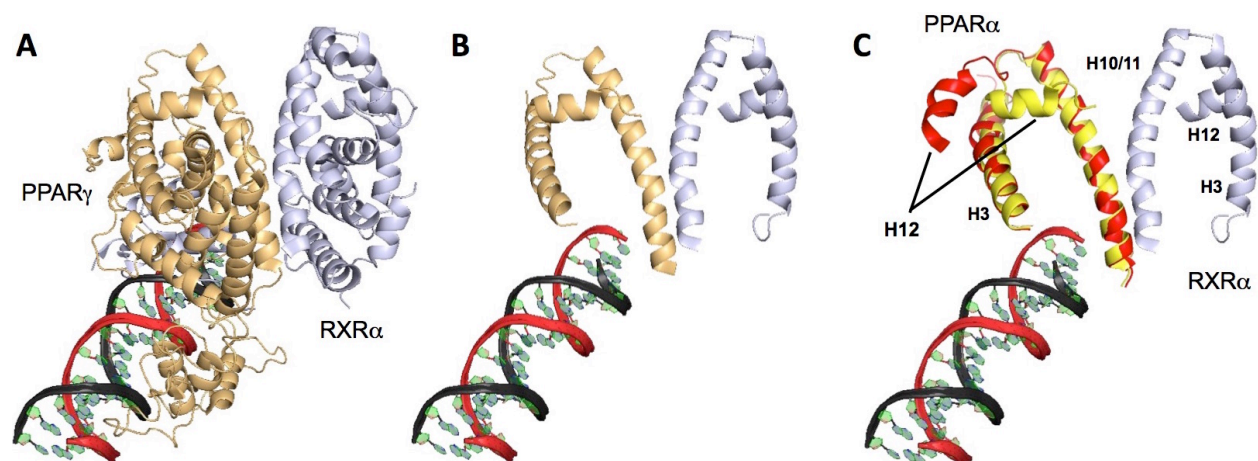


Abbildung 5: Konformationsänderung der Helix 12 in Abhängigkeit des Ligendentyps. A) Kristallstruktur des DNA-gebundenen PPARγ (beige):RXRα (grau) Dimers (wie in Abbildung 4). PDB ID: 3DZU, Chandra *et al.* 2008 ^[43]. B) Zur besseren Übersicht der Helix 12 Konformation und relativen Lage zu anderen Elementen sind hier nur die Helices 3, 10/11 und 12 der beiden Kernrezeptoren dargestellt. C) Die PPARγ LBD-Elemente aus B) wurden durch die entsprechenden Elemente der PPARα LBD ersetzt, um die Konformationsänderung der Helix 12 bei Bindung eines Agonisten (aktivierender Ligand, gelb, PDB ID 1K7L ^[306]) im Vergleich zu ihrer Position bei Bindung eines inversen Agonisten (reprimierender Ligand, rot, PDB ID 1KKQ ^[307]) zu verdeutlichen. Im Agonisten-gebundenen Zustand ist die Helix 12 eingeklappt und bildet stabilisierende Kontakte mit Helix 11 aus. Die Bindung des inversen Agonisten führt zum Herausklappen der Helix 12 relativ zur restlichen LBD.

Bei der Bindung eines Agonisten, d.h. eines aktivierenden Liganden, in die Ligandenbindungs-tasche der PPARs nimmt die Helix 12 (AF-2) die aktive Konformation ein. Dabei ist sie in Richtung Helix 11 eingeklappt und bildet stabilisierende Kontakte mit Resten der Helix 11 aus (Abbildung 5, vorherige Seite). Geladene Reste von Helix 3 und 12 formen eine *Charge-Clamp*, die die Helix 12 in der aktiven Konformation verankert ^[1]. Diese Positionierung ermöglicht die Rekrutierung von Co-Aktivatoren, die über das helikale Co-Aktivator-Motiv LXXLL (L = Leucin, X = beliebige Aminosäure) an die LBD binden.

Inverse Agonisten sind hingegen Liganden, die zu einer verstärkten Repression der Transkription noch unter das Level der durch den unligierten Rezeptor ausgeübten basalen Repression führen. Die Bindung eines inversen Agonisten führt zum Herausklappen der Helix 12 relativ zur restlichen LBD. Diese Konformation ermöglicht die Bindung von Co-Repressoren über das CoRNR-Box Motiv LXXXIXXX(I/L) (I = Isoleucin) (*Co-Repressor Nuclear Receptor Box*) ^[1]. Das CoRNR-Box Motiv bildet eine verlängerte Helix, die in der aktiven Konformation des Kernrezeptors gegen die eingeklappte Helix 12 stoßen würde, sodass eine Bindung von Co-Repressoren in der aktiven Konformation ausgeschlossen ist (Abbildung 57) ^[1].

1.2 Regulation der Transkription durch PPAR β/δ

PPAR β/δ beeinflusst als Transkriptionsfaktor der Kernrezeptor-Superfamilie die Transkription seiner Zielgene in unterschiedlicher Weise. Genomweite Analysen unserer Arbeitsgruppe ermöglichten ^[7] die Abgrenzung von drei Kategorien der transkriptionellen Antwort. Während Zielgene vom Typ I lediglich eine Liganden-unabhängige Repression durch PPAR β/δ zeigten, wurde bei Zielgenen des Typs II zusätzlich eine Liganden-induzierte (Agonisten-induzierte) Aktivierung beobachtet. Typ III Zielgene wiesen eine Liganden-unabhängige Aktivierung durch PPAR β/δ auf und zeigten sich bei Agonistengabe nicht oder nur schwach responsiv. Es wurden Hinweise auf eine Korrelation zwischen PPARE-Sequenz und Zielgen-Antwort gefunden. Weiterhin scheint ein Zusammenhang zwischen der biologischen Funktion der Zielgene und ihrer Integration in das regulatorische Netzwerk zu bestehen. So konnte ein Großteil der Typ II Zielgene dem Lipidmetabolismus zugeordnet werden, was auf die anderen Typen der transkriptionellen Antwort nicht zutrifft. Die Beobachtung, dass die Zuordnung eines bestimmten Zielgens zwischen verschiedenen Zelltypen abweichen kann, legt nahe, dass auch Zelltyp-spezifische Einflussgrößen wie zum Beispiel die Verfügbarkeit von Co-Regulatoren eine wichtige Rolle für die Ausprägung der transkriptionellen Antwort spielen. In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass insbesondere die Zielgene vom Typ II auch eine Responsivität gegenüber inversen Agonisten in Form einer verstärkten transkriptionellen Repression aufweisen ^[8]. In den folgenden Kapiteln wird vor allem auf diese Zielgen-Gruppe näher eingegangen.

1.2.1 Basale Repression durch den unligierten PPAR β/δ Rezeptor

Alle drei PPAR-Subtypen können in Lösung mit dem *Nuclear Receptor Co-Repressor* (NCoR) interagieren. Es wurde jedoch gezeigt, dass PPAR α und PPAR γ diese Eigenschaft verlieren, wenn sie an DNA binden. PPAR β/δ ist als einziger Subtyp auch nach erfolgter DNA-Bindung mit NCoR assoziiert. Dieses Merkmal bildet die Grundlage einer im Gegensatz zu den anderen PPARs einzigartigen Fähigkeit zur PPRE-vermittelten transkriptionellen Repression durch den unligierten PPAR β/δ Rezeptor (basale Repression) ^[259, 319] (Abbildung 6).

Neben NCoR kann PPAR β/δ auch die Co-Repressoren SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptors*) und SHARP (*SMRT/HDAC1 Associated Repressor Protein*) rekrutieren ^[148, 259]. Die Kernrezeptor Co-Repressoren NCoR und SMRT können direkt mit HDAC3 und den Klasse II HDACs 4 und 5 interagieren ^[51, 109]. Der Aufbau und die Funktionen von NCoR/SMRT-Komplexen sind in Kapitel 1.3 näher beschrieben.

1.2.2 Aktivierung der Zielgen-Transkription bei Agonisten-Bindung

Die Bindung eines Agonisten an PPAR β/δ bewirkt eine Konformationsänderung des Kernrezeptors, die zur Dissoziation der oben beschriebenen Co-Repressoren führt und im Gegenzug die Rekrutierung von Co-Aktivatoren begünstigt (Abbildung 6). Zu den endogenen PPAR β/δ Agonisten gehören ungesättigte Fettsäuren (z. B. Linolsäure) ^[252], Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) ^[159] und 15-HETE (*15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid*) ^[201]. Weiterhin wurden synthetische Agonisten wie zum Beispiel GW501516 ^[215] und L165,041 ^[25] (Anhang Abb. Z6) entwickelt.

Es sind zahlreiche Co-Aktivatoren bekannt, die mit Kernrezeptoren interagieren. Unter den mit PPARs assoziierten Co-Aktivatoren, konnte für PPAR β/δ bisher nur eine Interaktion mit den drei Mitgliedern der SRC/NCoA-Familie (*Steroid Receptor Coactivator*, *Nuclear Receptor Coactivator*) SRC/NCoA 1-3 gezeigt werden ^[317]. Ihre Fähigkeit, die Histon-Acetyltransferasen (HATs) CBP (*CREB-binding Protein*) und p300 zu rekrutieren, ist essentiell für die SRC-vermittelte transkriptionelle Aktivierung ^[308]. Allerdings besitzen SRCs auch selbst eine (weniger gut charakterisierte) enzymatische Aktivität als Histon-Acetyltransferasen ^[265]. Histon-Acetyltransferasen (HATs) sind die Gegenspieler der Histon-Deacetylasen (HDACs) und aktivieren die Transkription durch die Übertragung von Acetylgruppen auf Lysinreste in den Histonschwänzen und die Acetylierung vieler Nichthistonproteine. Eine wichtige Funktion von Histon-Acetylierungen ist die Rekrutierung von Aktivatoren über deren Bromodomänen ^[126]. Aktivatoren, wie zum Beispiel chromatinremodellierende oder histonmodifizierende Proteine, enthalten häufig mehrere Bromodomänen und binden oftmals an mehrere acetylierte Lysine desselben Proteins ^[175]. Weiterhin interagieren die SRCs mit CARM1 (*Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1*)

und PRMT1 (*Protein Arginine Methyltransferase*), die durch die Methylierung von Histonen und anderen Substraten zur transkriptionellen Aktivierung beitragen ^[308, 317].

PPAR β/δ interagiert, wie viele andere Kernrezeptoren ^[172], mit der MED1-Untereinheit des Mediator-Komplexes, die als Anker für den Multiprotein-Komplex fungiert ^[317]. Wie in Kapitel 1.5.2 genauer ausgeführt wird, verknüpft der Mediator-Komplex Co-Aktivatoren wie CBP/p300 mit dem Präinitiationskomplex der basalen Transkriptionsmaschinerie, der den Startpunkt der RNA-Polymerase II vermittelten Transkription bildet ^[288, 317].

1.2.3 Repression der Transkription durch inverse Agonisten

Inverse Agonisten sind Liganden, deren Bindung an PPAR β/δ eine Konformationsänderung bewirkt, die in einer verstärkten Repression der Zielgen-Transkription noch unter das Level der basalen Repression resultiert (im Gegensatz zu neutralen Antagonisten, die durch Konkurrenz die Bindung von Agonisten und inversen Agonisten stören und so die Transkription hin zum Niveau des ligandenfreien Zustands modulieren, Anhang Abb. Z7 (d.h. im Fall von PPAR β/δ zur basalen Repression)). Abbildung 6 zeigt eine schematische Zusammenfassung der transkriptionellen Regulationstypen durch den Kernrezeptor PPAR β/δ :

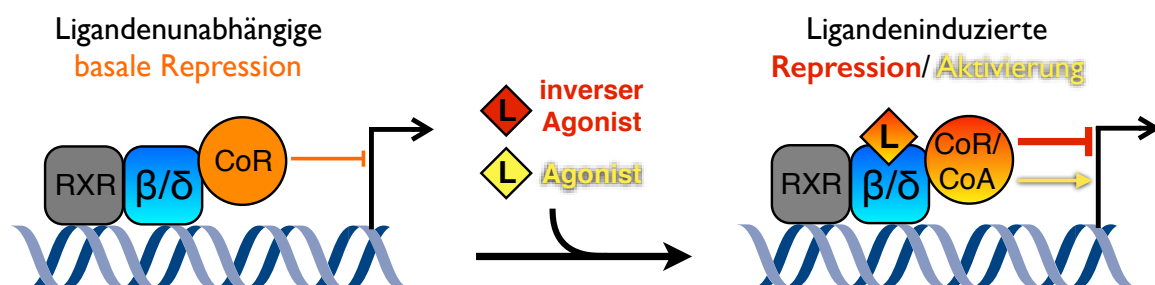


Abbildung 6: Schema der transkriptionellen Regulation durch PPAR β/δ (Typ II Zielgene). Links: Der unligierte PPAR β/δ -Rezeptor übt durch die Rekrutierung von Co-Repressoren (CoR) eine basale Repression (orange) auf die Transkription der Zielgene aus. Rechts: Die Bindung eines Agonisten führt zur Dissoziation dieser Co-Repressoren und begünstigt die Rekrutierung von Co-Aktivatoren (CoA). Es kommt zur Aktivierung der Transkription (gelb). Inverse Agonisten bewirken durch die Rekrutierung von Co-Repressoren eine verstärkte Repression der Transkription unter das Level der basalen Repression (rot). T. Adhikary (modifiziert).

Im Kontext der Rolle PPAR β/δ s in verschiedenen krankheitsassoziierten Prozessen macht diese Eigenschaft inverse Agonisten zu interessanten Kandidaten in der Wirkstoffentwicklung ^[202]. Es sind bereits mehrere synthetische (bisher keine endogenen) inverse PPAR β/δ Agonisten bekannt. So identifizierten und charakterisierten Shearer *et al.* 2007 ^[258] den Liganden GSK-0660, der zwar PPAR β/δ spezifisch agiert, aber keine ausreichende Bioverfügbarkeit aufweist.

Im Zuge dieser Studie wurde der oben beschriebene repressive Effekt von inversen Agonisten erstmals für die Typ II Zielgene *ANGPTL4* (*Angiopoietin-like 4*, auch *FIAF Fasting-induced Adipocyte Factor*) und *CPT1A* (*Carnitine Palmitoyltransferase 1A*) gezeigt. Basierend auf der Struktur von GSK0660 synthetisierten Naruhn *et al.* 2011 ^[202] den inversen Agonisten ST247, der eine höhere Affinität zu PPAR β/δ aufweist und in äquimolaren Mengen stärkere Effekte zeigt. Durch die Weiterentwicklung des Liganden ST247 konnte schließlich der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 mit einer verbesserten Plasmastabilität generiert werden ^[279] (Strukturen siehe Anhang, Abb. Z6). Sowohl ST247 als auch PT-S264 entstanden aus einer Kollaboration unseres Labors mit dem Arbeitskreis Diederich des Instituts für Pharmazeutische Chemie in Marburg.

1.2.4 Das PPAR β/δ -Zielgen *ANGPTL4*

In genomweiten Analysen unserer Arbeitsgruppe ^[7, 8] zeigte das Typ II PPAR β/δ Zielgen *ANGPTL4* eine besonders starke Regulation durch PPAR β/δ Liganden, sowohl durch den Agonisten GW501516 als auch durch den inversen Agonisten ST247. Das *ANGPTL4* Gen kodiert für ein sezerniertes Protein, das nach der Sekretion eine proteolytische Spaltung in ein N-terminales (nANGPTL4) und ein C-terminales (cANGPTL4) Fragment unterläuft. Während die Hauptfunktion von nANGPTL4 die Inhibition der Lipoprotein Lipase ^[174] ist, wurde das C-terminale Fragment mit der Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung gebracht ^[269]. Die Expression von *ANGPTL4* korreliert für die überwiegende Mehrheit der Krebstypen negativ mit dem Überleben ^[191].

Verschiedene Transkriptionsfaktoren können über mehrere regulative Elemente des Locus Einfluss auf die Transkription des *ANGPTL4*-Gens nehmen (Abbildung 7). Der PPAR-Enhancer liegt im dritten Intron ca. 3500 Basenpaare stromabwärts des Transkriptionsstarts (TSS, *Transcription Start Site*) und enthält ein Cluster von drei PPRES im Abstand von ca. 100 Basen ^[128]. Diese besondere Topologie könnte für die besonders starke Responsivität des Gens zu PPAR β/δ ursächlich sein. In unseren genomweiten Analysen ^[7] zeigten Zielgene mit drei PPRES im PPAR-responsiven Enhancer, wie *ANGPTL4* und *PK4*, die stärkste Regulation durch einen PPAR β/δ Agonisten, während Zielgene mit zwei PPRES (*PLIN2*, *ABCA1*) oder einem PPRES (*CPT1A*, *SLC25A20* und viele weitere) weniger stark reguliert waren. Die Transkription von *ANGPTL4* kann auch durch das Zytokin TGF β induziert werden, dessen terminale Effektoren unter anderem SMAD-Transkriptionsfaktoren sind. An Position -8500 relativ zum TSS befindet sich ein TGF β -responsiver Enhancer, der neben SMAD-bindenden Elementen (SBEs) auch Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren enthält.

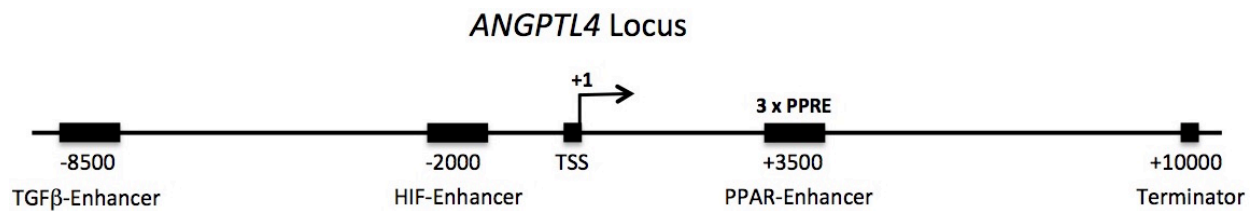


Abbildung 7: Topologie des *ANGPTL4*-Locus und bekannte regulative Elemente. Das PPAR-Zielgen *ANGPTL4* steht unter der Kontrolle mehrerer distaler regulativer Elemente. Im dritten Intron, ca. 3500 Basenpaare stromabwärts der TSS, liegt der PPAR-Enhancer mit drei PPRES (jeweils im Abstand von ca. 80 Basenpaaren). Das TGFβ-responsive Element befindet sich 8500 Basenpaare stromaufwärts der TSS. Hier finden sich neben mehreren SMAD-bindenden Elementen (SBEs) auch Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP1, ETS, RUNX und SP ^[128]. An Position -2000 befindet sich ein weiterer Enhancer, der mit einer Regulation durch den HIF1a Transkriptionsfaktor in Verbindung gebracht wurde ^[112].

Unsere Arbeitsgruppe konnte eine synergistische Regulation der *ANGPTL4*-Transkription durch PPARβ/δ Agonisten und TGFβ (und andere Stimuli) nachweisen ^[112, 128]. Wie Padua *et al.* 2008 ^[218] zeigten, ist die TGFβ-vermittelte Induktion der *ANGPTL4*-Transkription ein zentraler fördernder Schritt im Prozess der Metastasierung von Brustkrebszellen. *ANGPTL4* zerstört vaskulär-endotheliale Zell-Zell-Kontakte, erhöht die Permeabilität der Lungenkapillaren und vereinfacht die Intravasation der Tumorzellen. In einer Kooperation mit dem Arbeitskreis Diederich des Instituts für Pharmazeutische Chemie in Marburg wurde in unserer Arbeitsgruppe neben den inversen PPARβ/δ Agonisten ST247 und PT-S264 auch der strukturell verschiedene inverse Agonist DG172 entwickelt. Wie in einer Studie unseres Labors aus dem Jahr 2013 gezeigt werden konnte, üben ST247 und DG172 eine transkriptionelle Repression des *ANGPTL4* Gens aus, die sich gegenüber onkogenen Signalwegen wie dem TGFβ-*Signaling* dominant verhält. Durch den dominant-repressiven Effekt konnte die TGFβ-induzierte, *ANGPTL4*-abhängige Invasion von MDA-MB231 Brustkrebszellen in ein Matrigel unterbunden werden. Die verstärkte transkriptionelle Repression durch die inversen PPARβ/δ Agonisten zeigte sich auch dominant gegenüber anderen aktivierenden Stimuli wie Insulin, PMA, Dexamethason und bFGF ^[8].

1.3 NCoR- und SMRT-Komplexe

Die Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren wird häufig über die Rekrutierung von Co-Regulatoren (Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren) vermittelt. NCoR- bzw. SMRT-Komplexe wurden als Co-Repressor Komplexe von Kernrezeptoren beschrieben und tragen als solche maßgeblich zur Repression der Transkription von Kernrezeptor-Zielgenen bei.

1.3.1 NCoR und SMRT

Entdeckung und Sequenzhomologie von NCoR und SMRT

Die Co-Repressoren NCoR und SMRT wurden im Jahr 1995 erstmals als Interaktoren der Kernrezeptoren TR (*Thyroid Receptor*) und RAR (*Retinoic Acid Receptor*) beschrieben und mit der ligandenunabhängigen Repression in Verbindung gebracht ^[45, 104]. Sie werden von den Genen *NCOR1* bzw. *NCOR2* kodiert und weisen eine starke Aminosäure-Sequenzhomologie (insgesamt ca. 40 %), besonders im Bereich der Interaktionsdomänen von Untereinheiten der NCoR- bzw. SMRT-Komplexe, auf (Abbildung 8) ^[295]. Eine hohe Prävalenz intrinsisch ungeordneter Regionen (IDRs) ^[295] und ihre Größe von 2440 bzw. 2514 Aminosäuren (Quelle: Ensembl) weisen auf eine Funktion als Plattform für die Bindung mehrerer Interaktionspartner hin ^[99].

Domänenstruktur von NCoR und SMRT

NCoR und SMRT besitzen eine vergleichbare Domänenstruktur (Abbildung 8). Die N-terminal gelegene Repressionsdomäne 1 (RD1) ^[156, 189] enthält Interaktionsoberflächen für die Untereinheiten GPS2 (*G-Protein Pathway Suppressor 2*) und TBL1 (*Transducin β -like 1*) des NCoR- bzw. SMRT-Repressor-Komplexes ^[212, 321]. Weitere Repressionsdomänen befinden sich eher im Mittelteil der Proteine ^[156] und vermitteln die Interaktion mit den Klasse IIa HDACs 4, 5 und 7 ^[79, 109, 133, 189].

Im N-Terminus enthalten NCoR und SMRT jeweils zwei SANT-Domänen (zwischen RD1 und RD2 gelegen), konservierte Proteindomänen mit einer Länge von ca. 50 Aminosäuren. Ihr Vorkommen in den Proteinen SWI3, ADA2, NCoR und TFIIB ist namensgebend ^[2]. In der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur bilden SANT-Domänen drei α -Helices aus, die in einer Helix-turn-Helix-Konformation organisiert sind. Konservierte aromatische Reste in diesen Helices übernehmen eine Schlüsselrolle für deren Anordnung, womit SANT-Domänen große Ähnlichkeit mit der DNA-Bindungsdomäne von c-Myb aufweisen ^[35]. Das Mitchell Lazar Labor untersuchte die Funktionen der SANT-Domänen von NCoR- und SMRT genauer. Wie sie zeigten, ist die SANT-Domäne 1 (SANT1) Teil der Deacetylase-Aktivierungsdomäne (DAD), die zur Rekrutierung und Aktivierung von HDAC3 (Klasse I) erforderlich ist ^[51, 93]. Die zweite SANT-Domäne (SANT2)

agiert hingegen als Teil der Histon-Interaktionsdomäne (HID) und bindet präferentiell an unacetylierte Histone ^[315]. Durch diese Bindung schirmt die SANT2-Domäne unacetylierte Histone von der Zugänglichkeit für Histonacetyltransferasen (HATs) ab und blockiert deren Aktivität ^[315]. Trotz einer hohen Sequenzhomologie sind die Funktionen der beiden SANT-Domänen sehr distinkt, und es konnte gezeigt werden, dass sie funktionell nicht gegeneinander austauschbar sind ^[93, 315]. Ein 2005 von Codina *et al.* ^[51] angestellter Vergleich von Strukturen der MYB-DBD mit der DAD- und SANT2-Domäne von SMRT ergab, dass die DAD-Domäne eine zusätzliche Helix (H0) aufweist und die räumliche Orientierung der dritten Helix der SMRT-DAD (SANT1) signifikant von der in MYB-DBD und SMRT-SANT2 vorliegenden Positionierung abweicht. SANT1 und 2 fördern synergistisch die Deacetylierung von Histonen: SANT1 rekrutiert und aktiviert HDAC3, SANT2 erhöht die Affinität des SMRT/HDAC-Komplexes für Histone, verstärkt die Repression und schirmt bereits deacetylierte Histone von HATs ab ^[315].

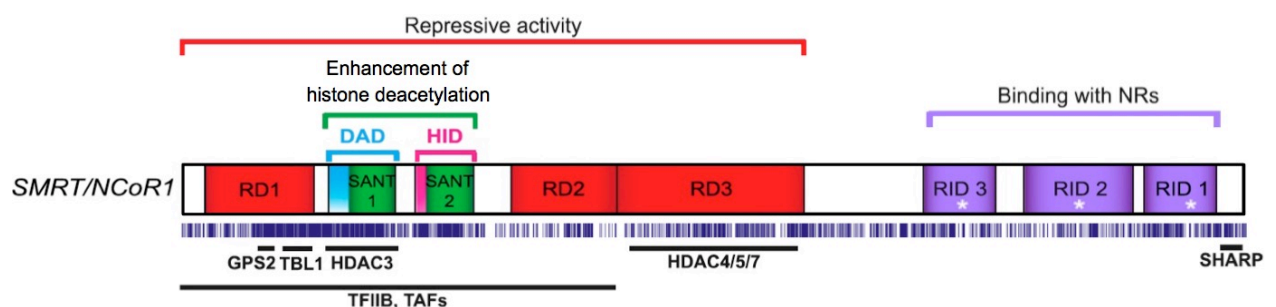


Abbildung 8: Schema der Domänenstruktur von NCoR bzw. SMRT. Die Co-Repressoren NCoR und SMRT zeigen eine hohe Sequenzhomologie (dargestellt durch blaue Striche unterhalb des Schemas, entnommen aus Watson *et al.* 2012 ^[295]). Die Repressionsdomänen (RD, rot) erstrecken sich vom N-Terminus bis zur Mitte der Proteine und beinhalten Interaktionsoberflächen für Untereinheiten der NCoR- bzw. SMRT-Repressor-Komplexe. NCoR und SMRT tragen zwei SANT-Domänen im N-Terminus, von denen die erste Teil der Deacetylase-Aktivierungsdomäne (DAD, hellblau) und die zweite zur Histon-Interaktionsdomäne (HID, rosa) gehört. Die Interaktion mit Kernrezeptoren erfolgt über die CoRNR-Box Motive (weiße Sterne) in den C-terminal gelegenen Rezeptor-Interaktionsdomänen (RIDs, violett). Modifiziert aus Mottis *et al.* 2013 ^[189].

Während sich der für die Repression verantwortliche Bereich vom N-Terminus bis zur Mitte erstreckt, vermittelt der C-Terminus von NCoR und SMRT die Interaktion mit Kernrezeptoren (Abbildung 8). Es sind drei Rezeptor-Interaktionsdomänen (RIDs) bekannt ^[296], wobei jedoch Transkriptvarianten beschrieben wurden, die aufgrund von alternativem Spleißen nicht alle RIDs enthalten ^[90]. Die Bindung an Kernrezeptoren erfolgt über die in den RIDs enthaltenen CoRNR-Box Motive mit der Konsensussequenz LXXXIXXX(I/L) (L = Leucin, I = Isoleucin, X = beliebige Aminosäure) ^[1, 107, 225].

Neben Kernrezeptoren können NCoR- und SMRT allerdings auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren ^[295]. Eine Bindung an den generellen Transkriptionsfaktor (GTF) TFIIB und TAF-Untereinheiten des GTF TFIID wurde ebenso beschrieben ^[195, 303]. Im C-Terminus befindet sich eine Interaktionsoberfläche für den Co-Repressor SHARP (*SMRT/HDAC1 Associated Repressor Protein*), der ebenfalls an Kernrezeptoren binden kann ^[260].

1.3.2 Aufbau des NCoR- bzw. SMRT-Kernkomplexes

NCoR und SMRT bilden große Co-Repressor Komplexe von 1,5-2 MDa Größe. Li *et al.* identifizierten 2000 die Histondeacetylase HDAC3 und das WD40-Repeat-enthaltende Protein TBL1 als zwei Kernkomponenten dieser Komplexe ^[157, 311]. Wie Zhang *et al.* 2002 ^[321] zeigen konnten, ist das Protein GPS2 eine weitere wesentliche Komponente des NCoR- bzw. SMRT-Komplexes. Das TBL1-verwandte Protein TBL1R (*TBL1-related*) kann ebenfalls mit den Komplexen assoziieren. Die Interaktionsoberflächen für TBL1 und GPS2 liegen im N-Terminus von SMRT bzw. NCoR innerhalb der RD1 Domäne (Kapitel 1.3.1) ^[321]. HDAC3 assoziiert hingegen mit der DAD-Domäne, die das SANT1-Motiv enthält. TBL1 und HDAC3 interagieren nicht direkt miteinander, stattdessen dient SMRT als eine Plattform und fungiert als Brücke zwischen den beiden anderen Untereinheiten ^[94].

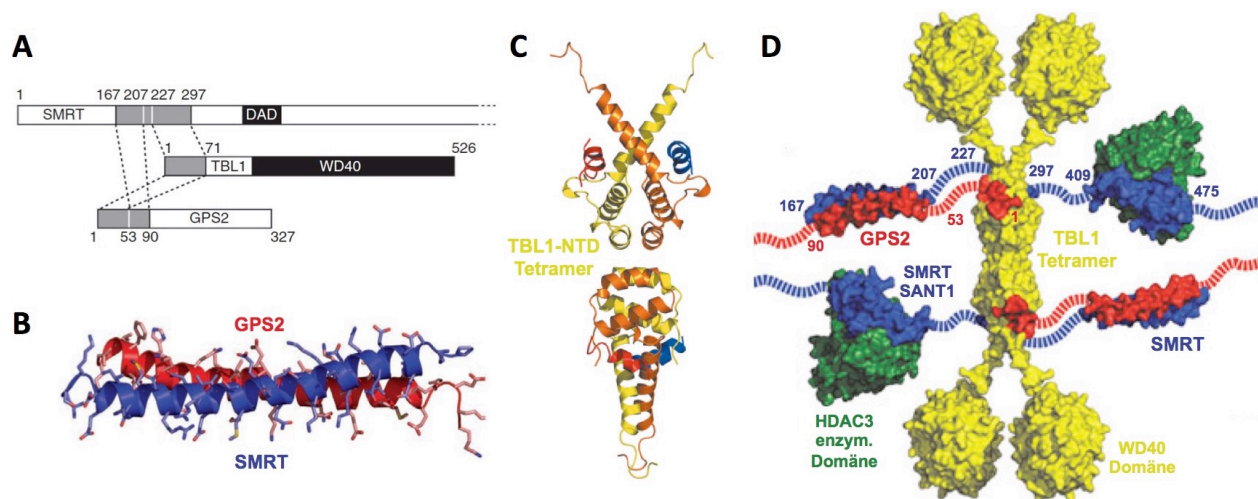


Abbildung 9: Interaktion der Kernkomponenten von SMRT-Komplexen. A) Kartierung der Interaktionsbereiche von SMRT, TBL1 und GPS2. B) SMRT und GPS2 interagieren über eine antiparallele „coiled-coil“-Struktur miteinander. C) TBL1 (gelb/orange) bildet über seine N-terminale Domäne Tetramere aus, die jeweils zwei Bindungstaschen für GPS2 (rot) und SMRT (blau) formen. D) Modell der Interaktionen von Kernkomponenten des SMRT-Komplexes. Die Untereinheiten sind stöchiometrisch mit dem Verhältnis 4:2:2:2 organisiert (TBL1, gelb: SMRT, blau: GPS2, rot: HDAC3 (grün)). A)-B) Modifiziert aus Oberoi *et al.* 2011 ^[212]. C)-D) modifiziert von <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2011/sb/sb4> [Stand: 08.05.2019] ^[75]

Oberoi *et al.* nutzten 2011 ^[212] NMR- und Kristallstruktur-Analysen um die Interaktionen zwischen den Kernkomponenten des SMRT/ NCoR-Komplexes eingehender zu untersuchen. Sie konnten die Interaktionsbereiche von SMRT, TBL1 und GPS2 mittels Co-Immunpräzipitationen zunächst genauer eingrenzen (Abbildung 9A). Anhand der gewonnenen Daten führten sie strukturelle Studien mit den jeweils minimal für die Interaktion erforderlichen Proteinbereichen durch. Ihre Analysen zeigten, dass GPS2 und SMRT über eine antiparallele „*coiled-coil*“-Struktur miteinander interagieren (Abbildung 9B). TBL1 bzw. TBLR1 bildet Dimere aus, die sich schließlich in Tetrameren zusammenfinden (Abbildung 9C) und das Zentrum des Komplexes bilden. Durch die antiparallele Ausrichtung von GPS2 und SMRT werden ihre TBL1-Bindungsstellen am gleichen Ende positioniert. Die Interaktion mit TBL1 erfolgt schließlich über jeweils eine der symmetrisch angeordneten Bindungstaschen eines TBL1-Dimers. Zusammenfassend entwickelten Oberoi *et al.* 2011 ^[212] unter Einbeziehung der verfügbaren Strukturanalysen das in Abbildung 9D dargestellte Modell für die Interaktionen der Kernkomponenten von NCoR/ SMRT-Komplexen. Demnach stehen die einzelnen Untereinheiten stöchiometrisch in einer 4:2:2:2 (TBL1:NCoR/SMRT:GPS2: HDAC3) Beziehung.

1.3.3 Interaktoren und Funktionen der NCoR- bzw. SMRT-Komplexe

Deacetylase-abhängige Repression

Wie bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben, ist die Deacetylase HDAC3 (Klasse I) eine Kernkomponente des NCoR/ SMRT-Komplexes ^[157]. Ihre Rekrutierung an die DAD-Domäne (enthält SANT1) von SMRT bzw. NCoR ist für die vollständige Aktivierung ihrer katalytischen Funktion essentiell ^[51, 93, 312]. Die HID-Domäne (enthält SANT2) trägt durch die Erhöhung der Affinität des Komplexes für Histone und die Abschirmung bereits deacetylierter Histone gegen HATs zusätzlich zur Repression bei ^[315]. Acetylierte Lysine in den Histonen fungieren als Interaktionsoberfläche für die Rekrutierung von Aktivatoren über deren Bromodomänen (Kapitel 1.2.2) ^[126]. Die Deacetylierung der Lysin-Reste verhindert die Rekrutierung dieser Aktivatoren.

Trotz der Namensgebung „Histon-Deacetylase“ können HDACs auch Nicht-Histonproteine deacetylieren. Analoges gilt für die Acetylierung von Nicht-Histonproteinen durch HATs (Histon-Acetyltransferasen). In jüngerer Zeit finden daher die Begriffe KATs und KDACs Verwendung. Diese Bezeichnungen beschreiben die Funktion der Enzyme, also die Acetylierung bzw. Deacetylierung von Lysinen (Aminosäure: Lys, K), umfassender und sind nicht auf einen Substrattypus beschränkt.

Einige Proteine, die Funktionen während des Transkriptionszyklus übernehmen, werden durch Acetylierungen reguliert. Wie Fu *et al.* 2007 ^[83] zeigten, fördert eine Acetylierung von Lysin 44 in CDK9 (*cyclin-dependent kinase 9*, Untereinheit von P-TEFb; für weitere Erläuterungen siehe

Kapitel 1.4.3) dessen Kinase-Aktivität. In dieser Studie wurde beobachtet, dass die Deacetylierung von CDK9 durch NCoR/SMRT-Komplexe die transkriptionelle Elongationsfunktion der Kinase beeinträchtigt. Auch die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIE, TFIIF ^[111] und TFIIB ^[50] werden acetyliert. Durch die Acetylierung von TFIIB wird die Interaktion zwischen TFIIB und TFIIF stabilisiert und die Transkription aktiviert ^[50].

Rekrutierung von Klasse IIa HDACs

Wie bereits in Kapitel 1.3.1 erwähnt, können NCoR und SMRT mit den Klasse IIa HDACs 4, 5 und 7 interagieren. Im Gegensatz zur Klasse I HDAC3 werden diese jedoch nicht durch die Bindung an die DAD-Domäne rekrutiert, sondern binden über die Repressionsdomäne 3 an den Komplex ^[79, 109, 133, 189]. Eine Aktivierung der enzymatischen Aktivität von HDAC4, wie sie für HDAC3 nachgewiesen wurde, konnte nicht gezeigt werden ^[93]. Fischle *et al.* untersuchten diesen Aspekt 2002 ^[79] genauer und beobachteten, dass HDAC4 im NCoR/SMRT-HDAC3-Komplex enzymatisch inaktiv ist und nicht zur Deacetylase-Aktivität des Komplexes beiträgt. Aufgrund ihrer Ergebnisse postulierten sie, dass HDAC4 lediglich durch die Rekrutierung von NCoR/SMRT-HDAC3-Komplexen mit Deacetylase-Aktivität assoziiert ist und ihre repressive Funktion unabhängig von einer intrinsischen Deacetylase-Aktivität ist ^[79]. In einer früheren Studie gelangten die Forscher für HDAC7 bereits zu ähnlichen Schlüssen. Wang *et al.* beschrieben 1999 ^[290] zusätzlich zur C-terminal gelegenen „Deacetylase-Domäne“ eine Repressionsdomäne im N-Terminus von HDAC4, die unabhängig voneinander die Transkription reprimieren können.

Deubiquitinierung

Die Ubiquitin-spezifische Protease USP44 interagiert mit den WD40-Repeats im C-Terminus von TBL1. Ein Substrat dieser Ubiquitinase ist monoubiquitiniertes Histon H2B ^[151]. Die Ubiquitinierung von Histon H2B an Lysin 120 trägt zur Dekompaktierung des Chromatins bei ^[78] und wurde mit der Initiation und Elongation der Transkription in Verbindung gebracht ^[151]. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Ubiquitinierung des entsprechenden Lysins 123 eine Grundvoraussetzung für die ebenfalls mit transkriptioneller Aktivierung assoziierten Methylierungen von Lysin 4 und Lysin 79 an Histon H3 sind ^[206, 266]. Wie Lan *et al.* 2016 ^[151] beobachteten, trägt die Deubiquitinierung von H2Bub1 durch USP44 zur repressiven Aktivität des NCoR-Komplexes bei.

Weitere Interaktoren

Als weiterer Interaktionspartner von NCoR und SMRT wurde mSin3 beschrieben, welches unter anderem mit HDAC1 und HDAC2 einen Repressorkomplex ausbildet ^[200, 303]. Gemäß GST-Pull-down-Experimenten von Wong *et al.* aus dem Jahr 1998 scheint der Bereich von Aminosäure 214 bis 336 von SMRT für diese Interaktion erforderlich zu sein ^[303]. Somit überlappt der Bindungsbereich von mSin3 mit der von Oberoi *et al.* 2011 auf die Aminosäuren 227-297 einge-

grenzten Interaktionsoberfläche von TBL1 ^[212]. Es wäre daher denkbar, dass sich die Bindung von TBL1 und mSin3 an SMRT möglicherweise gegenseitig ausschließt. Es wurde allerdings eine weitere mSin3-Interaktionsoberfläche im C-Terminus beschrieben.

Picard *et al.* beobachteten 2004 ^[231] eine Interaktion von NCoR und SMRT mit der Klasse III HDAC Sirtuin 1 (Sirt1), die 2007 mit der Repression durch den Androgen-Rezeptor in Verbindung gebracht wurde ^[56].

Die Untereinheit CORO2A (Coronin 2A) wird durch die Deubiquitinierungsaktivität von USP19 in NCoR/SMRT-Komplexen stabilisiert ^[160]. Wie Lim *et al.* 2016 ^[160] zeigten, fördert CORO2A die transkriptionelle Repression durch den Kernrezeptor RAR.

1.4 Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II (mRNA)

DNA-abhängige RNA-Polymerasen katalysieren die Synthese von RNA-Molekülen, wobei ein DNA-Strang als Matrize fungiert ^[297]. Dieser Prozess wird als Transkription bezeichnet. Die Sequenz des resultierenden RNA-Strangs (Transkript) ist komplementär zur abgelesenen DNA-Sequenz (Template-Strang) und entspricht damit der Sequenz des kodierenden Strangs. Die Transkription protein-kodierender Gene und somit die Synthese von (prä-)mRNA (*messenger* RNA, Boten-RNA) erfolgt in Eukaryonten durch die RNA-Polymerase II (Pol II) ^[12]. Nach der Prozessierung der prä-mRNAs im Zellkern werden die reifen mRNAs ins Zytoplasma transportiert und dienen dort als Template für die Proteinsynthese an den Ribosomen (Translation) ^[12].

Der Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II ist ein mehrstufiger, sehr fein abgestimmter Prozess, der das konzertierte Zusammenspiel zahlreicher Interaktoren der generellen Transkriptionsmaschinerie sowie genereller Co-Faktoren erfordert ^[276]. Dieses komplexe Netzwerk weist mehrere Kontrollpunkte auf und gewährleistet so den geordneten Ablauf der einzelnen Teilschritte der Transkription, die in den nachfolgenden Kapiteln genauer besprochen werden.

1.4.1 Formation des Präinitiationskomplexes (PIC)

Vor dem Beginn der Transkription formieren sich die einzelnen Komponenten der generellen Transkriptionsmaschinerie am Promotor und bilden gemeinsam den Präinitiationskomplex (PIC, *Preinitiation Complex*). Dem sequenziellen Modell entsprechend erfolgt die Bindung der einzelnen generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) schrittweise in einer definierten Reihenfolge ^[256, 276]. Seit einigen Jahren wird allerdings ein alternativer Pfad für die Bildung des PIC diskutiert, der die Bindung eines bereits aus mehreren GTFs und der RNA-Polymerase II zusammengesetzten Pol II Holoenzym-Komplexes an den bereits am Promotor sitzenden TFIID (und TFIIA) beschreibt ^[145, 146].

TFIID bindet an Kernpromotor-Elemente

Die Formation des PIC wird durch die Bindung von TFIID an den Promotor eingeleitet. Diese erfolgt an TATA-Box enthaltenden Promotoren über die Untereinheit TBP (TATA-bindendes Protein) ^[132, 229, 247], während sie an TATA-losen Promotoren durch TBP assoziierte Faktoren (TAFs) vermittelt wird (Abbildung 10) ^[41, 153, 235, 257]. Wie Chasman *et al.* (1993, in Hefe) ^[44] und Nikolov *et al.* (1996, human) ^[207] anhand von Kristallstrukturen zeigen konnten, weist TBP eine sattelförmige Struktur auf, dessen Bindung in die kleine Furche der DNA eine starke Krümmung des DNA-Doppelstrangs (um ca. 80°) induziert und so die Bindung der nachfolgenden GTFs erleichtert (Abbildung 11A) ^[134, 136, 244, 256]. Die entstehende Formung der DNA, geprägt durch eine geweitete kleine Furche und eine gestauchte große Furche, steht der Konformation einer

von Nukleosomen besetzten TATA-Sequenz (komprimierte kleine Furche) entgegen. Aufgrund dieser Beobachtung wird angenommen, dass die Bindung von TFIID an den Promotor ein erneutes nukleosomales Verpacken und somit die Störung eines bereits im Aufbau befindlichen Präinitiationskomplexes verhindert ^[39, 216]. Neben dieser Funktion für die Vorbereitung der PIC-Formation besitzt TFIID, vermittelt durch seine Untereinheit TAF1, mehrere enzymatische Aktivitäten und kann neben Histonen auch andere Transkriptionsfaktoren und Co-Faktoren durch Acetylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen modifizieren. Für mehrere der im TFIID-Komplex enthaltenen TBP assoziierten Faktoren (TAFs) wurde eine Interaktion mit anderen GTFs und verschiedenen Transkriptionsaktivatoren gezeigt ^[216, 276].

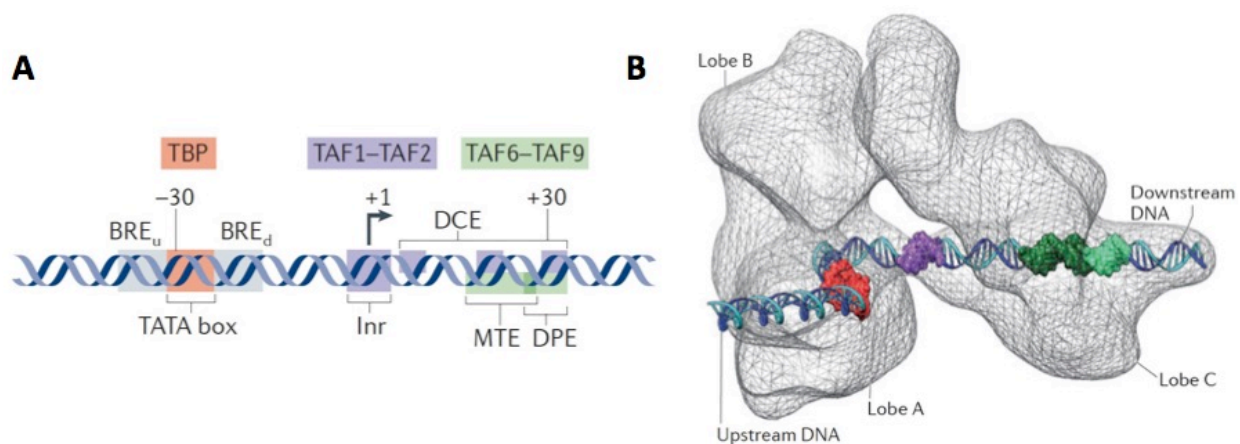


Abbildung 10: TFIID-Bindung an Kernpromotor-Elemente. A) Humane Kernpromotor-Elemente. Rot: Die TFIID-Untereinheit TBP bindet an die TATA-Box Sequenz ca. 25-30 Nukleotide stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (+1). Violett: TAF1 und TAF2 können die Initiator (Inr) Sequenz erkennen, die den Transkriptionsstart umgibt. Grün: Das *Downstream Promoter Element* (DPE) und das *Motif Ten Element* (MTE) kann von TAF6 und TAF9 erkannt werden. BRE: *B Recognition Element*, DCE: *Downstream Core Element*. B) *Low-Resolution* Elektronenmikroskopie: Architektur des humanen TFIID gebunden an Promotor-DNA mit einer TATA-Box (rot), Initiator Sequenz (violett), *Motif Ten Element* (dunkelgrün) und *Downstream Promoter Element* (hellgrün). Aus Sainsbury *et al.* 2015 ^[244].

TFIIA stabilisiert den TBP-DNA Komplex

TFIIA kann als unterstützender Faktor den TBP-DNA Komplex stabilisieren, indem es mit der Unterseite der TBP-Sattelstruktur und einer stromaufwärts der TATA-Box gelegenen Region interagiert ^[31, 85, 244]. Dabei bindet das TFIIA-Heterodimer an die Seite des Komplexes, die der Bindungsstelle von TFIIB gegenüberliegt (Abbildung 11B). Wie aus Kristallstrukturen von Geiger *et al.* 1996 (Hefe) ^[85] und Bleichenbacher *et al.* 2003 (human) ^[31] hervorgeht, wird die Interaktion zwischen TBP und DNA dadurch nicht verändert. Weiterhin übernimmt TFIIA die Aufgabe eines Anti-Repressors im Bezug auf unterschiedliche Regulationsmechanismen, die die DNA-Bindung von TBP negativ beeinflussen. So fördert TFIIA zum Beispiel die Dissoziation von TBP-Dimeren ^[52], verhindert durch die Belegung einer überlappenden Bindungsfläche

an TBP die TAF1-vermittelte Inhibition der Erkennung von TATA-Sequenzen ^[144] und blockiert die BTAF1-vermittelte Dissoziation von bereits gebildeten TBP-TATA-Komplexen ^[17].

TFIIB rekrutiert die RNA-Polymerase II und assistiert in der TSS-Selektion

Die Krümmung der DNA durch TFIID ermöglicht (unabhängig von der Anwesenheit von TFIIA) die Interaktion von TFIIB mit dem Phosphodiester-Rückgrat der DNA ^[216] sowohl stromaufwärts (große Furche) als auch stromabwärts der TATA-Box ^[281], resultierend in einer weiteren Stabilisierung des Komplexes (Abbildung 11). Während TBP in beiden Orientierungen an die TATA-Box binden kann, sorgt die Interaktion von TFIIB mit dem BRE (*TFIIB Recognition Element*), einem stromaufwärts der TATA-Box gelegenen Promotor-Element, für einen unidirektionalen Aufbau des PIC ^[281].

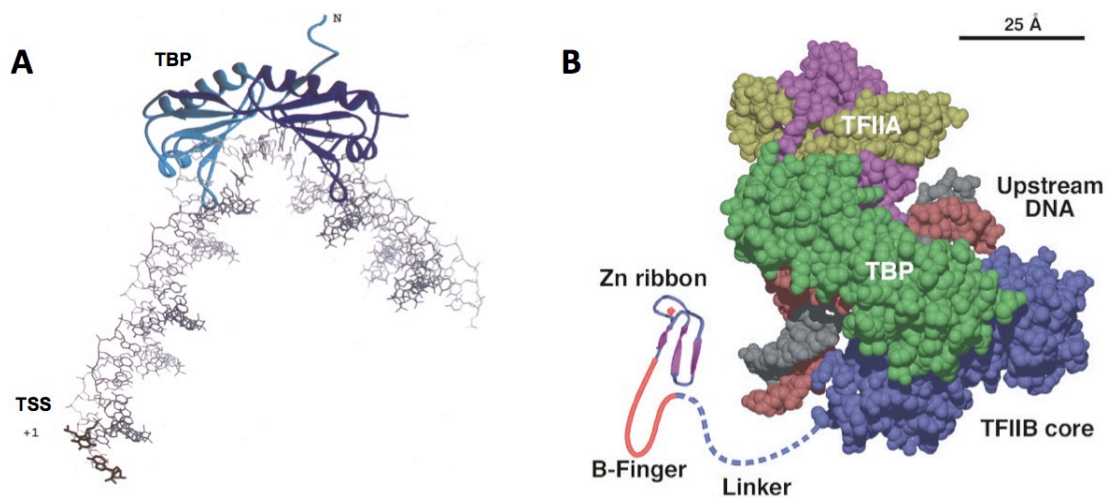


Abbildung 11: Struktur des TBP-TATA (A) bzw. des TBP-TFIIA-TFIIB-DNA Komplexes (B). A) Struktur des TBP-TATA-Element Komplexes (aus Orphanides *et al.* 1996 ^[216]). TBP (blau) bindet an die kleine Furche der TATA-Sequenz und induziert eine starke Krümmung der DNA (grau). B) Strukturmodell des TBP-TFIIA-TFIIB-DNA Komplexes (aus Hahn *et al.* 2004 ^[97]). TFIIA (große Untereinheit magenta, kleine Untereinheit gelb) und TFIIB (blau) flankieren TBP (grün) und die DNA (rot und schwarz) an gegenüberliegenden Seiten. Die Zinc-Ribbon-Domäne von TFIIB ist mit der B-Finger Domäne verbunden und ragt im PIC ins aktive Zentrum der RNA-Polymerase II. Sie ist über einen flexiblen Linker mit der TFIIB Core-Domäne verbunden.

TFIIB agiert als Bindeglied von TFIID mit der RNA-Polymerase II und TFIIF, weshalb seine Anwesenheit für deren Rekrutierung unbedingt erforderlich ist ^[216]. Wie von Chen und Hahn ^[46, 47] gezeigt werden konnte, unterstützt TFIIB die Positionierung der DNA im zentralen Spalt der Polymerase II. Aus einer Co-Kristallstruktur der RNA-Polymerase II mit TFIIB von Bushnell *et al.* 2004 ^[38] geht hervor, dass eine fingerartige Struktur von TFIIB (*B-Finger/ B-Reader*) ins aktive Zentrum der Polymerase II ragt. Dort kommt sie in räumliche Nähe zur RAP74- Untereinheit von TFIIF ^[46, 47], sodass TFIIB die Selektion der Transkriptionsstartstelle (TSS, *transcription start site*) durch Pol II und TFIIF unterstützen kann ^[276].

TFIIF begleitet die RNA-Polymerase II zum Promotor

Während die RNA-Polymerase II alleine nicht stabil mit den bisher anwesenden GTFs assoziieren kann, ermöglicht die vorherige Bildung eines RNA-Polymerase II/ TFIIF Komplexes eine stabile Interaktion mit den bereits an der DNA befindlichen PIC-Komponenten (Abbildung 12)^[81]. Diese stabilisierende Funktion von TFIIF für die Bindung der RNA-Polymerase II wird einerseits über zusätzliche Protein-DNA Interaktionsoberflächen vermittelt. Robert *et al.* beobachteten 1998^[239] allerdings darüber hinaus eine starke Veränderung der DNA-Topologie, die mit einer dichten Wicklung der Promotor-DNA um die Polymerase einhergeht. Die RAP74-Untereinheit von TFIIF ist nahe des aktiven Zentrums der Polymerase II positioniert und kooperiert, wie bereits angedeutet, mit dem in der Nähe befindlichen TFIIB-Finger und der Polymerase bei der Selektion der Transkriptionsstartstelle^[86].

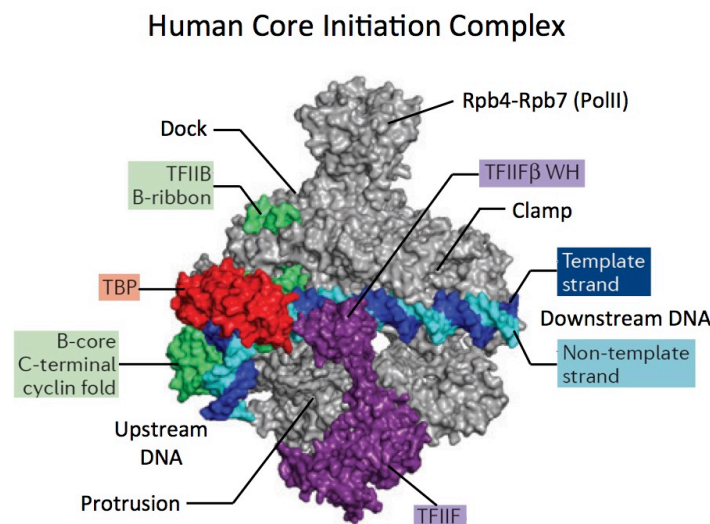


Abbildung 12: Architektur des humanen Core-PolII-Initiationskomplexes. Das Modell des humanen Core-Initiationskomplexes^[101] verdeutlicht, wie die generellen Transkriptionsfaktoren TFIID (Untereinheit TBP, rot), TFIIB (grün) und TFIIF (violett) den Kontakt der RNA-Polymerase II (grau) mit dem Promotor ermöglichen. Modifiziert aus Sainsbury *et al.* 2015^[244].

TFIIE rekrutiert TFIIH und stimuliert dessen enzymatische Aktivität

Wie Maxon *et al.* 1994^[179] zeigen konnten, bindet TFIIE selektiv an die unphosphorylierte Form der RNA-Polymerase II in der Nähe des aktiven Zentrums. Die Positionierung der TFIIE α -Untereinheit ca. zehn Nukleotide vor dem Transkriptionsstart und somit direkt stromaufwärts der in der offenen Konformation des PIC entstehenden Transkriptionsblase, legt nahe, dass TFIIE die Öffnung der DNA unterstützt^[82]. Die Untereinheit TFIIE β besitzt drei WH-Domänen (*winged helix*), die gemeinsam mit einer WH-Domäne von TFIIF den Polymerase-Spalt überspannen und so die DNA daran hindern den Spalt zu verlassen^[101]. TFIIE fungiert als Brücke zwischen der RNA-Polymerase II und TFIIH und erleichtert so dessen Rekrutierung^[179]. Durch die Stimulation der DNA-abhängigen ATPase- und CTD-Kinase-Aktivität (CTD der großen Untereinheit

der RNA-Polymerase II RPB1) von TFIIH trägt TFII ϵ zur Bildung eines initiationsfähigen PIC bei [166, 213, 214, 254]. Während die TFII ϵ -Untereinheit die Helikase-Aktivität der TFIIH-Untereinheit XPB stimulieren kann, wirkt die TFII α -Untereinheit durch ihre inhibitorische Aktivität dem entgegen und ermöglicht so eine feine Abstimmung beim Öffnen der DNA [161].

TFIIH ist für die Promotor-Öffnung erforderlich

Die Bildung des PIC wird durch die Rekrutierung von TFIIH abgeschlossen, wodurch ein initiationskompetenter Komplex entsteht [216]. TFIIH besitzt mehrere Untereinheiten mit enzymatischer Aktivität, anhand derer eine funktionelle Unterteilung in zwei Subkomplexe möglich ist. Der CAK-Komplex (*CDK-activating Kinase Complex*) besteht aus der Cyclin-abhängigen Kinase CDK7, Cylin H und MAT1 [3, 80]. Die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II RPB1 (RPB1 CTD) durch den CAK-Komplex [166, 261] ist für den Übergang von der Initiation der Transkription zur Elongation essentiell. Der Kernkomplex beinhaltet, neben weiteren Untereinheiten, die ATP-abhängigen Helikasen XPB (3' zu 5') und XPD (5' zu 3') [64, 249], die beide eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität besitzen [53]. Die katalytischen Funktionen von TFIIH spielen eine wesentliche Rolle in den ersten Schritten der Transkriptionsinitiation und werden daher im nachfolgenden Kapitel (1.4.2) genauer besprochen. Neben seiner Funktion bei der Transkription von mRNA, übernimmt TFIIH wichtige Aufgaben in der DNA-Reparatur [64, 248].

1.4.2 Initiation der Transkription

Promotor-Melting (Promotor-Schmelze)

Die Zugänglichkeit der Nukleotide des Matrizenstrangs für die RNA-Polymerase II ist eine grundlegende Voraussetzung, um das Ablesen der DNA-Sequenz und die Synthese der RNA zu ermöglichen. Im Vorfeld der Initiation ist daher die Trennung des DNA-Doppelstrangs erforderlich. Wie bereits in Kapitel 1.4.1 angedeutet, kooperieren die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIH (Helikase-Aktivität der ERCC3-Untereinheit (XPB)) [95, 135] (siehe Abbildung 13) und TFII ϵ (Feinabstimmung der enzymatischen Aktivität von TFIIH) [161] in diesem als Promotor-Schmelze bezeichneten Prozess. Wie Kostrewa *et al.* 2009 [147] zeigen konnten, ist auch die *Linker*-Region von TFII β (*B-Reader Loop*) an der Öffnung der DNA beteiligt (Abbildung 13). Kim *et al.* untersuchten im Jahr 2000 [135] den Mechanismus der Promotor-Schmelze durch TFIIH. Anhand ihrer Beobachtungen vermuteten sie einen Mechanismus ähnlich einem „molekularen Schraubenschlüssel“. Die Rotation der stromabwärts gelegenen DNA relativ zur (durch Protein-DNA Interaktionen) fixierten DNA stromaufwärts erzeugt Spannung, was zur Öffnung des involvierten DNA-Abschnitts führt [135].

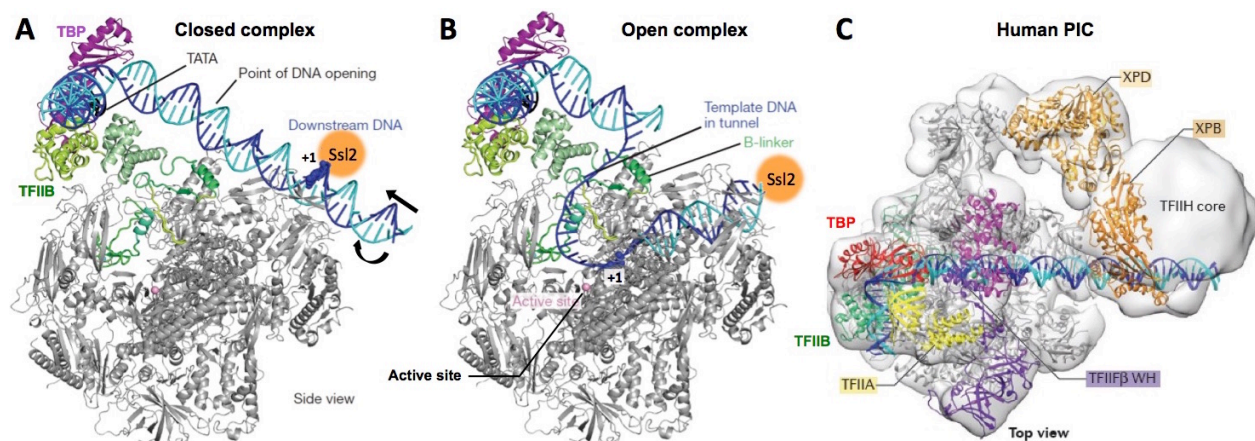


Abbildung 13: Funktion von TFIIF in der Promotoröffnung. Modelle des geschlossenen (A) und des geöffneten (B) RNA-Polymerase II (Pol II)-TFIIF-TATA box-binding protein (TBP)-DNA Komplexes basierend auf der Pol II-TFIIF Kristallstruktur (PDB ID: 3K1F) sind gezeigt (Hefe). Die Lokalisation von Ssl2 (entspricht XPB, ERCC3 human) an der stromabwärts gelegenen DNA und die scheinbare Bewegung der DNA während der Promotoröffnung sind durch Pfeile dargestellt. Gemäß dem derzeitigen Modell für die DNA-Öffnung fungiert die ATPase Ssl2 als Translocase, die die stromabwärts gelegene DNA in den Spalt mit dem aktiven Zentrum der Pol II einfädelt, während die stromaufwärts gelegene DNA fixiert bleibt. Aus Kostrewa *et al.* 2009 ^[147], modifiziert nach Sainsbury *et al.* 2015 ^[244]. C) Der humane Präinitiationskomplex zum Vergleich. Modifiziert aus Sainsbury *et al.* 2015 ^[244].

Während die Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II Energie aus der Hydrolyse von ATP erfordert, wurde eine solche ATP-Abhängigkeit für andere RNA-Polymerasen nicht beobachtet ^[37, 247]. Orphanides *et al.* spekulierten 1996 ^[216], dass das Energie-Erfordernis aus einer für den Pol II PIC einzigartigen Konformation der Promotor-DNA resultiert, die eine energetische Barriere für die Promotor-Schmelze darstellt.

Selektion der Transkriptionsstartstelle

Bevor die erste Phosphodiester-Bindung geknüpft werden kann, erfolgt die Selektion der Transkriptionsstartstelle (TSS). Wie bereits in Kapitel 1.4.1 angesprochen, sind TFIIF und TFIIB (*B-Finger/ B-Reader*) nahe des aktiven Zentrums der Polymerase positioniert und wirken mit ihr bei der Selektion der TSS zusammen. Kostrewa *et al.* untersuchten 2009 ^[147] die Rolle von TFIIB für die TSS-Selektion in Hefe. In dieser Studie führten gezielte Mutationen in der *B-Reader* Region zu einer Verschiebung des Transkriptionsstarts. Mutationen der Positionen -8 und -7 der Initiator-Sequenz (Inr) in der Promotor-DNA hatten ebenfalls eine Verlagerung der TSS zur Folge. Aus ihren Beobachtungen schlossen Kostrewa *et al.* ^[147], unter Einbeziehung von Kristallstruktur-Daten, dass die Erkennung der Position -8 der Inr Sequenz durch die *B-Reader* Helix für die Selektion des Transkriptionsstarts von entscheidender Bedeutung ist (Abbildung 14). Demnach wird die DNA mit Hilfe der *B-Reader* Helix von TFIIB nach der Transkriptionsstartstelle abgesucht, während der Matrizenstang am aktiven Zentrum der RNA-Polymerase entlang in den Spalt gleitet ^[245, 256].

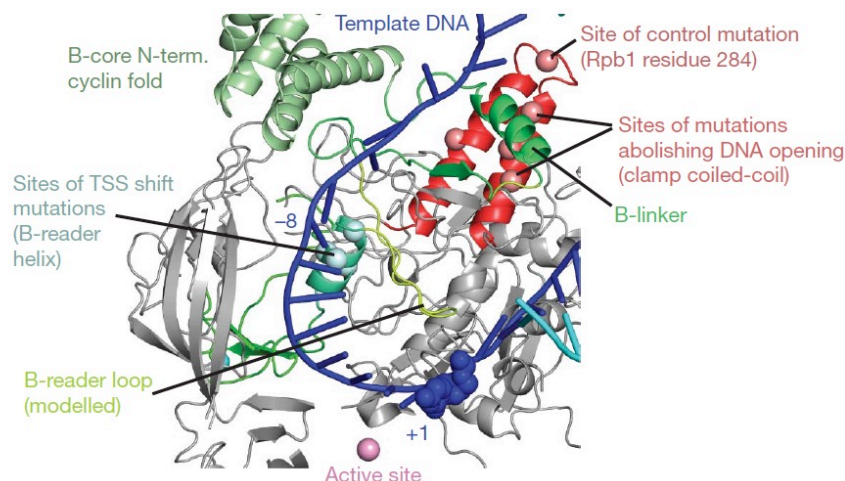


Abbildung 14: Unterstützung der Selektion des Transkriptionsstarts durch TFIIB. Region um das aktive Zentrum aus dem Modell des geöffneten Präinitiationskomplexes (Abbildung 13). Die *B-Reader* Helix ist nahe der Position -8 des Template-Strangs positioniert. Reste, die für die TSS-Selektion wichtig sind, werden als grüne Sphären dargestellt. Aus Kostrewa *et al.* 2009 ^[147].

Transition von abortiver Initiation zu produktiver Initiation

Sobald der Transkriptionsstart erkannt wurde, beginnt die RNA-Polymerase II, die aus mehreren Untereinheiten besteht, mit der Synthese der RNA. Mit der Knüpfung der ersten Phosphodiester-Bindung wandelt sich der Präinitiationskomplex (PIC) zum initial transkribierenden Komplex (ITC, *Initially Transcribing Complex*) ^[246]. Dieser ist zunächst relativ instabil und durchläuft mehrfach einen Prozess, der als abortive Initiation bezeichnet wird. Dabei kommt es wiederholt zum Abbruch der Transkription, und es werden sehr kurze RNA-Fragmente von lediglich 2-3 Nukleotiden Länge freigesetzt. Kugel und Goodrich untersuchten im Jahr 2000 ^[149] die Kinetik der frühen Schritte der RNA-Synthese durch die RNA-Polymerase II. Sie konnten zeigen, dass bei einer Länge von vier Nukleotiden des entstehenden RNA-Transkripts ein Übergang eintritt, der als *Escape Commitment* (Flucht-Versprechen) bezeichnet wird (Abbildung 15). Der Komplex wird durch den Kontakt des *B-Readers* mit dem fünften RNA-Nukleotid weiter stabilisiert und die Rate der abortiven Initiation sinkt ^[38, 246, 256]. Sainsbury *et al.* beschrieben im Jahr 2013 ^[245] eine stimulierende Funktion von TFIIB für die anfängliche RNA-Synthese vermittelt durch die Stabilisierung der Polymerase-Clamp. Weiterhin vermuteten sie eine unterstützende Funktion bei der Trennung des DNA-RNA-Strangs, indem das Transkript vom Loop des *B-Readers* zum Austrittstunnel gelenkt wird ^[245]. Durch die Kollision des naszierenden Transkripts mit dem *B-Finger* von TFIIB kommt es zunehmend zu Spannungen im Komplex, die schließlich bei einer Länge von sieben Nukleotiden zum Zusammenbruch der Transkriptionsblase und wenige Nukleotide später zur Verdrängung von TFIIB führen ^[219, 246, 256]. Die volle Länge des RNA-DNA-Hybrids ist mit 8-9 Basenpaaren erreicht. An diesem Punkt endet die abortive Initiation sowie die Notwendigkeit der ATP-Hydrolyse ^[149, 246] und es entsteht der frühe elongierende Komplex (EEC, *Early Elongating Complex*).

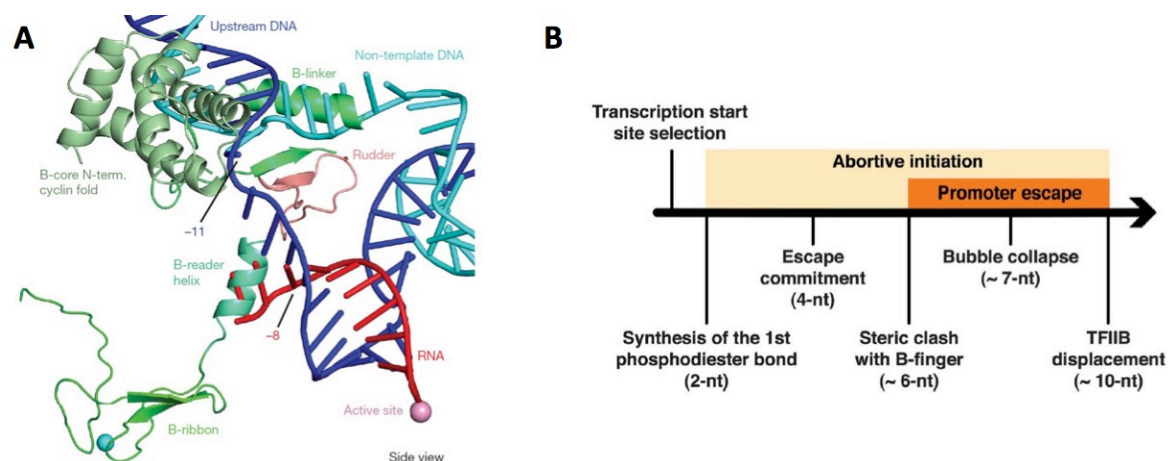


Abbildung 15: Transition von abortiver Initiation zu produktiver Initiation. A) Die Kollision des Transkripts mit der Helix des *B-Readers* von TFIIB ab einer Länge von ca. sieben Nukleotiden führt zu Spannungen im Komplex. Daraus resultiert schließlich der Zusammenbruch der Transkriptionsblase und es kommt zur Verdrängung von TFIIB. Aus Kostrewa *et al.* 2009 ^[147]. B) Schematische Übersicht zum Ablauf der Transkriptionsinitiation der RNA-Polymerase II. Aus Liu *et al.* 2011 ^[163].

RNA-Polymerase II CTD

Der Phosphorylierungsstatus der C-terminalen Domäne (CTD) der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II RPB1 übernimmt entscheidende Funktionen im Ablauf der einzelnen Schritte des Transkriptionszyklus. Die CTD besteht im humanen System aus 52 Tandem-*Repeats* eines Heptapeptids mit der Konsensussequenz Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (YSPTSPS) ^[216]. Im Präinitiationskomplex liegt die C-terminale Domäne von RPB1 zunächst unphosphoryliert vor ^[165]. Während der PIC-Formation wird die Kinase-Aktivität von CDK7 (Untereinheit des CAK-Komplexes von TFIIH) durch TFIIIE stimuliert ^[213, 214, 254]. Die Phosphorylierung des Serins an Position fünf (Ser5-P) der Heptapeptid-*Repeats* durch CDK7 ^[117, 166, 254] führt zur Initiation ^[276, 304]. Der Transkriptionszyklus wird von weiteren Phosphorylierungen der CTD begleitet, die teils in späteren Kapiteln besprochen werden. Sie unterstützen die Rekrutierung von Faktoren, die in bestimmten Stadien der Transkription benötigt werden und koppeln die Transkription mit co-transkriptionellen Vorgängen wie mRNA-Capping und -Prozessierung ^[180, 256].

1.4.3 Elongation

Promotor-proximales Pausieren, 5'-Capping Checkpoint

Mit dem Verlassen des Promotors durch die RNA-Polymerase II (*Promotor Escape*) beginnt die Phase der Elongation. Beim Erreichen der Position +20 bis +60 tritt jedoch ein Phänomen ein, das als Promotor-proximales Pausieren bezeichnet wird ^[4, 246]. Wie der Name bereits verdeutlicht, pausiert die RNA-Polymerase II dabei in der Nähe des Promotors und kann erst durch bestimmte Signale den Übergang zur produktiven Elongation vollziehen. Das Promotor-proxi-

male Pausieren wird durch die Bindung der beiden Faktoren DSIF (*DRB Sensitivity-inducing Factor*) und NELF (*Negative Elongation Factor*) induziert ^[232, 310]. Glover-Cutter *et al.* wiesen 2009 ^[89] eine wichtige Funktion der Kinase-Aktivität der TFIIF-assoziierten CDK7 (vermutlich durch die Phosphorylierung von Serin 7 der CTD) für die Rekrutierung von NELF und somit für die Einleitung der Promotor-proximalen Pause nach. Ein möglicher Mechanismus für das DSIF- und NELF-vermittelte Pausieren könnten Interaktionen mit dem naszierenden Transkript und der Polymerase II sein, die dazu führen, dass die Polymerase ihren Weg entlang des Gens nicht fortsetzen kann ^[84, 246]. Gemeinsam mit der Ser5-Phosphorylierung der CTD unterstützt die DSIF-Untereinheit SPT5 die Rekrutierung von Capping-Enzymen ^[241, 299]. Beobachtungen von Pei *et al.* aus dem Jahr 2003 ^[223] legen nahe, dass das 5'-Capping, d. h. das Anhängen eines 7-Methylguanosin-Caps am 5'-Ende der RNA, eine Voraussetzung für die Freigabe der Polymerase ist und das Promotor-proximale Pausieren somit als Checkpoint für das korrekte Capping fungiert ^[196, 223].

Pause-Release

Der Übergang vom Promotor-proximalen Pausieren zur produktiven Elongation erfordert die Kinase-Aktivität von P-TEFb (*Positive Transcription-Elongation Factor-b*) ^[176, 234]. Dieser Faktor besteht aus der Cyclin-abhängigen Kinase 9 (CDK9) und Cyclin T. Die Phosphorylierung von DSIF und NELF führt zur Dissoziation von NELF und wandelt DSIF in einen positiven Elongationsfaktor ^[84, 246, 309]. BRD4 (*Bromodomain-containing Protein 4*) bindet an acetylierte Histone und trägt im humanen System entscheidend zur Rekrutierung von P-TEFb bei ^[114]. Allerdings wurden auch Transkriptionsfaktoren wie c-MYC ^[131], Untereinheiten des Mediator-Komplexes (siehe Kapitel 1.5) wie MED26 ^[268] und andere Elongationsfaktoren mit der Rekrutierung von P-TEFb in Verbindung gebracht. So kann P-TEFb auch als Komponente des *Super-Elongation-Complex* (SEC) rekrutiert werden, der die Elongationsfaktoren ELL, AFF4 und andere Faktoren als weitere Untereinheiten enthält ^[162].

Wie Adelman *et al.* 2005 ^[5] zeigten, übernimmt auch der Cleavage-Faktor TFIIS eine wichtige Funktion für die effiziente Freigabe der RNA-Polymerase II, indem es in Zusammenarbeit mit TFIIF die Spaltungsaktivität der Polymerase für die naszierende RNA stimuliert. Durch diesen Vorgang wird die Entlassung von feststeckenden Polymerasen erleichtert ^[5, 246, 276, 320].

Produktive Elongation, co-transkriptionelle mRNA-Prozessierung

Sobald das Promotor-proximale Pausieren überwunden ist, kann die RNA-Polymerase II ihren Weg entlang des Gens fortsetzen und in die Phase der produktiven Elongation übergehen. Für das Ablösen der Capping-Enzyme vom Elongationskomplex ist die Desphosphorylierung von Serin 5 der CTD durch die Phosphatase FCP1 (TFIIF-assoziierte CTD Phosphatase 1) erforderlich ^[251]. Die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIF interagieren mit FCP1, wobei TFIIF dessen Phosphatase-Aktivität stimuliert ^[16, 42, 142]. Mit dem Voranschreiten der Elongation

nimmt die Serin 5 Phosphorylierung immer weiter ab. Dazu trägt die Ser5-P Phosphatase Ssu72, die nach dem *Pause Release* an DSIF bindet, in großem Maße bei ^[238]. Durch die Phosphorylierung von Serin 7 wird außerdem die Ser5-P Phosphatase RPAP2 rekrutiert ^[68, 188]. Durch die Kinase-Aktivität von P-TEFb (CDK9) ^[234] und CTDK1 (CDK12) ^[59, 116] steigt die Phosphorylierung des Serins an der zweiten Position der CTD-Repeats hingegen kontinuierlich an bis nahe des Polyadenylierungssignals ein Maximum erreicht ist (Abbildung 16) ^[117].

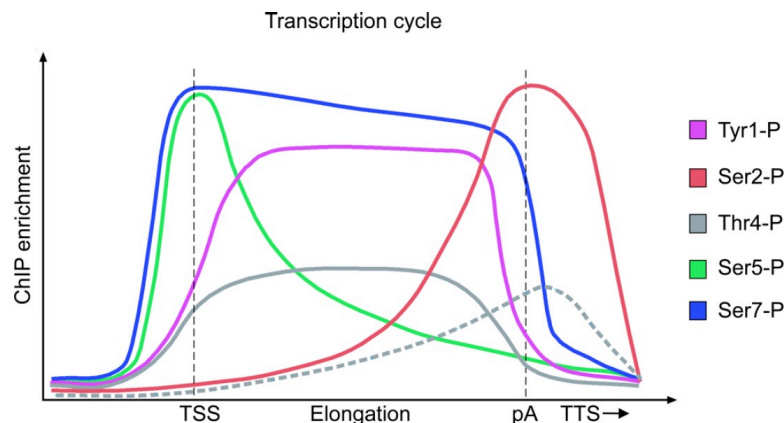


Abbildung 16: Phosphorylierungszustände der Pol II RPB1 CTD im Transkriptionszyklus. Die Veränderungen der CTD-Phosphorylierungen während des Transkriptionszyklus sind anhand von ChIP-Experimenten in *S. cerevisiae* dargestellt. Für Säugerzellen wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet (die gestrichelte Linie zeigt die Thr4-Phosphorylierung in Säugerzellen). Die Ergebnisse sind nicht auf die RNA-Polymerase II Level normalisiert. Erhöhte Level von Ser5-P am Transkriptionsstartstelle (TSS) und von Ser2-P an der Transkriptionsterminationsstelle (TTS) reflektieren (zumindest teilweise) erhöhte Level von RNA-Pol II. pA = Polyadenylierungsstelle. Aus Eick and Geyer 2013 ^[69] (weitere Referenzen siehe dort).

Während der Elongation bleibt stets ein Abschnitt von 8-9 Basen der naszierenden RNA an die Template-DNA gebunden. Die Aufrechterhaltung dieses kurzen RNA-DNA-Hybridbereichs ist von großer Wichtigkeit, um ein Ablösen der RNA-Polymerase von der DNA und eine daraus resultierende verfrühte Termination zu verhindern ^[256]. Das Zusammenspiel zahlreicher Elongationsfaktoren (z.B. Elongine und Komponenten des SEC) gewährleistet den korrekten Ablauf der Elongation und sorgt für eine hohe Prozessivität der RNA-Polymerase II ^[162, 262]. Die phosphorylierte CTD schafft eine Bindungsplattform für die Rekrutierung histonmodifizierender und chromatinremodellierender Faktoren, die das Fortschreiten der Polymerase entlang des Gens erleichtern ^[117]. Histon-Chaperone sorgen nach der Passage der Polymerase für einen effizienten Wiederaufbau der Nukleosomen ^[256]. Im Verlauf der Elongation trägt die phosphorylierte CTD zur Rekrutierung von Faktoren der mRNA-Prozessierungsmaschinerie bei und koppelt so die Transkription an die co-transkriptionelle RNA-Prozessierung ^[180]. Hierzu gehören die bereits angesprochenen Capping-Enzyme, Splicing-Faktoren und schließlich Faktoren, die für die Termination und die 3'-Prozessierung benötigt werden ^[117] (Genauerer hierzu siehe Kapitel 1.4.4).

1.4.4 Termination

Poly(A)-Signal und 3'-Pause

In Eukaryonten tragen proteinkodierende mRNAs in ihrer 3'-UTR (untranslatierte Region am 3'-Ende) in der Regel ein hoch konserviertes Polyadenylierungssignal (Poly(A)-Signal). Dieses ist durch das Hexamer AAUAAA^[302], gefolgt von einer G/U-reichen Sequenz, gekennzeichnet und übernimmt eine wichtige Funktion bei der Einleitung der Termination^[54]. Der *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor* CPSF bindet zunächst an den Proteinkörper der RNA-Polymerase II und überprüft den wachsenden RNA-Strang auf das Vorkommen des AAUAAA-Hexamers. Die Erkennung des Poly(A)-Signals durch CPSF induziert ein Pausieren der RNA-Polymerase II^[199]. Wie Davidson *et al.* 2014^[59] zeigen konnten, fördert dieses Pausieren der RNA-Polymerase II am 3'-Ende des Gens die verstärkte Phosphorylierung von Serin 2 der CTD durch CDK12. Diese Modifikation spielt eine entscheidende Rolle für die Termination und verbindet durch die Rekrutierung der involvierten Faktoren die Transkription mit der 3'-Prozessierung der mRNA^[10, 70, 92, 180].

Spaltung der RNA und 3'-Prozessierung

Das vermehrte Vorkommen von Ser2-P in der CTD ermöglicht die Rekrutierung des *Cleavage Stimulation Factors* CstF^[59, 199], der mit der GU-reichen Region 3' des AAUAAA-Hexamers interagiert^[224]. Da die Interaktionen von CPSF mit der Polymerase und mit CstF sich gegenseitig ausschließen, kommt es zu dessen Dissoziation vom Proteinkörper der Polymerase und CPSF wandert gemeinsam mit CstF an die CTD der Polymerase^[199]. Wie von Mandel *et al.* 2006^[173] gezeigt wurde, erfordert die Spaltung der prä-mRNA die Endonuklease-Aktivität von CPSF-73. Während nach der Spaltung die Polyadenylierung der prä-mRNA durch die Poly(A)-Polymerase erfolgt, wird der 3' liegende RNA-Abschnitt durch die 5'-3' Exonuklease XRN2 degradiert^[91]. Dies führt schließlich zur Termination der Transkription und zum Ablösen der RNA-Polymerase II von der DNA („Torpedo“-Modell). Weitere Faktoren (z.B. *Cleavage Factor* 1 und 2, CF1 und CF2), auf die an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen wird, sind an dem Prozess der Termination und 3'-Prozessierung beteiligt.

Rolle der Tyr1-Phosphorylierung der CTD (*S. cerevisiae*)

Die Arbeitsgruppe um P. Cramer konnte 2012 in *S. cerevisiae* zeigen, dass die Phosphorylierung von Tyrosin 1 der CTD-*Repeats* durch die Beeinträchtigung der Rekrutierung von Terminationsfaktoren eine verfrühte Termination der Transkription unterbindet^[178]. Das Tyr1-Phosphorylierungsniveau steigt kurz hinter dem Transkriptionsstart an und fällt erst nahe des Polyadenylierungssignals wieder ab, wodurch Terminationsfaktoren nahezu über den gesamten Genkörper fern gehalten werden (siehe Abbildung 16). In einer nachfolgenden Studie konnte

die CPF-Untereinheit (CPF = *Cleavage and Polyadenylation Factor*, Hefe-Homolog von CPSF) Glc7 als Tyr1-Phosphatase identifiziert werden ^[250]. Die Desphosphorylierung von Tyr1 durch Glc7 am Polyadenylierungssignal ist gemäß den Beobachtungen von Schreieck *et al.* 2014 ^[250] erforderlich für die Rekrutierung von Terminationsfaktoren und den korrekten Ablauf der Termination.

1.4.5 Reinitiation, Gen-Looping und Recycling der Polymerase

Reinitiation

Die Formation des Präinitiationskomplexes (PIC) (Kapitel 1.4.1) ist eine Grundvoraussetzung und einer der geschwindigkeitslimitierenden Schritte der RNA-Polymerase II abhängigen Transkription. Wie Jiang und Gralla 1993 ^[121] *in vitro* zeigen konnten, verläuft die Initiation, und somit die erste Transkriptionsrunde, deutlich langsamer als die Reinitiation in den darauffolgenden Transkriptionszyklen. Während die RNA-Polymerase bei der Initiation den Promotor mit TFIIF verlässt, und auch TFIIB vom PIC dissoziiert, verbleiben die übrigen PIC-Komponenten am Promotor und bilden den von Yudkovsky *et al.* 2000 ^[318] beschriebenen *Scaffold*-Komplex. Dieses Reinitiations-Intermediat wird durch Interaktionen von Aktivatoren mit den GTFs und dem Mediator-Komplex stabilisiert (Kapitel 1.5). Durch das Verbleiben einiger PIC-Komponenten am Promotor wird die Notwendigkeit der fortwährenden erneuten Formation des PIC, insbesondere der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Promotor-Erkennung durch TFIID, umgangen. Nach der verhältnismäßig schnellen Reinkorporation von TFIIB, TFIIF und der RNA-Polymerase II in den *Scaffold*-Komplex kann eine neue Transkriptionsrunde vom entstandenen Reinitiationskomplex (RIC) gestartet werden (Anhang Abb. Z3) ^[318]. Die Reinitiation begünstigt durch das schnelle Starten mehrerer Polymerasen in kurzen Zeitabständen das Entstehen von Polymerase-Konvois ^[272] und fördert somit höhere Transkriptionsraten ^[121].

Gen-Looping

O'Sullivan *et al.* beobachteten 2004 ^[217] in *S. cerevisiae* das Phänomen des Gen-Loopings, durch das eine räumliche Nähe zwischen Promotor und Terminator hergestellt werden kann. Eine Studie von Tan-Wong *et al.* lieferte 2008 ^[271] am Beispiel des *BRCA1*-Gens einen Nachweis für das Vorkommen von Gen-Loops in Säugern. Die Bildung dieser Gen-Loops erfordert, gemäß Studien der A. Ansari und M. Hampsey Gruppen, die Interaktion von Komponenten der Transkriptionsinitiations-Maschinerie mit Komponenten der Terminations-Maschinerie und ist abhängig von Aktivatoren ^[71]. Demnach interagiert der generelle Transkriptionsfaktor TFIIB mit Untereinheiten des *Cleavage Factors* 1 (CF1) und mit der Poly(A)-Polymerase ^[71, 181]. Aktivator sind mutmaßlich nicht direkt an der Loop-Formation beteiligt, sondern agieren indirekt

indem sie das Gen-Looping durch ihre Interaktion mit TFIIB erleichtern ^[71]. Die Interaktion von TFIIB mit der Terminator-Region ist abhängig von der CTD-Phosphatase Ssu72, einer Komponente des CPSF ^[100], und erfordert dessen enzymatische Aktivität ^[15, 263].

Wie Wang *et al.* 2010 ^[292] zeigen konnten, wird die Interaktion von TFIIB mit der Untereinheit CstF-64 des *Cleavage Stimulation Factors* durch die Phosphorylierung des Serins 65 des TFIIB N-Terminus reguliert. Während die Rekrutierung von CstF-64 sowohl an den Promotor als auch an den Terminator eine Abhängigkeit von dieser Modifikation aufwies, war bei der CPSF-Untereinheit Ssu72 nur die Rekrutierung an den Promotor betroffen. Demnach scheint die TFIIB-vermittelte Rekrutierung von CstF eine Voraussetzung für die Rekrutierung von CPSF an den Promotor zu sein, wohingegen die Rekrutierung an den Terminator davon unabhängig erfolgt.

Recycling der RNA-Polymerase II

Durch die Bildung von Gen-Loops wird das Übersetzen der RNA-Polymerase II vom Terminator zum Promotor und somit die erneute Verwendung desselben Polymerase-Moleküls in nachfolgenden Transkriptionsrunden ermöglicht. Die Reinkorporation der RNA-Polymerase II in den *Scaffold*-Komplex macht die Dephosphorylierung der CTD erforderlich, da nur die unphosphorylierte Form der Polymerase an den Reinitiationskomplex (RIC) binden kann. Das Entfernen der einzelnen Phosphorylierungen durch die Phosphatasen Fcp1 (Ser2-P, Ser5-P), Ssu72 (Ser5-P, Ser7-P) und RPAP2 (Ser5-P) ^[117] bereitet das Recycling der RNA-Polymerase II vor.

Wie die Beobachtungen der Ansari und Hampsey Gruppen nahelegen, könnte die Loop-Formation und das Übersetzen der Polymerase nach dem von Hampsey *et al.* 2011 ^[98] vorgeschlagenen Modell ablaufen. Demnach reassoziert TFIIB nach der endonukleatischen Spaltung und Polyadenylierung der mRNA mit der RNA-Polymerase II am Terminator. Durch die Bindung dieses Terminator-TFIIB-PolIII Komplexes an den *Scaffold*-Komplex kommt es zur Formation des Gen-Loops und die Reinitiation wird gefördert. Folglich wäre die erste Runde der Transkription erforderlich um den Weg für die Bildung des Loops zu bereiten. Der gebildete Gen-Loop erleichtert und beschleunigt daraufhin die Reinitiation nachfolgender Transkriptionszyklen durch die Übergabe der Polymerase vom Terminator zum Promotor ^[98].

1.5 Der Mediator-Komplex

Die Fähigkeit zur differentiellen Modulation der Transkription verschiedener Gene ist für Organismen eine grundlegende Voraussetzung, um in der Entwicklung spezialisierte Zelltypen ausbilden und adäquat auf Umweltreize reagieren zu können. Spezifische Transkriptionsfaktoren binden an ihre Zielsequenzen in regulativen Elementen der DNA und können die Transkription ihrer Zielgene in aktivierender oder reprimierender Weise beeinflussen. Die Genregulation durch Transkriptionsfaktoren kann über zahlreiche Mechanismen erfolgen und wird häufig durch die Rekrutierung von Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren vermittelt.

Regulative Elemente (Enhancer oder Silencer) können in der DNA mehrere Kilobasen vom Transkriptionsstart des durch sie regulierten Gens entfernt liegen. Um ihre Funktion auszuüben, kann es erforderlich sein, dass Transkriptionsfaktoren direkt oder indirekt über Co-Regulatoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie am Promotor in Kontakt treten. Der Multiprotein-Komplex Mediator übernimmt eine entscheidende Funktion in der Genregulation, indem er als Brücke zwischen Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie fungiert [264].

1.5.1 Aufbau und Struktur des Mediator-Komplexes

Nomenklatur der Untereinheiten

Der humane Mediator-Komplex kann bis zu 30 Untereinheiten beinhalten (Hefe: bis zu 25 Untereinheiten) [33]. Nachdem die Benennung von Mediator-Untereinheiten zunächst abhängig vom Entdeckungskontext in verschiedenen Organismen sehr variabel war (z.B. human: TRAP = *thyroid hormone receptor-associated protein*, DRIP = *vitamin D receptor interacting protein*, CRSP = *cofactor required for Sp1*), wurde die Nomenklatur 2004 vereinheitlicht, um die Übersichtlichkeit im Forschungsfeld zu verbessern [33]. Dabei einigten sich die führenden Forscher des Feldes auf eine Benennung nach dem Schema MEDxx, wobei xx für die der Untereinheit nach festgelegten Regeln zugeordnete Nummer steht [33]. In der Zukunft neu entdeckte Untereinheiten sollen mit fortlaufenden Nummern (angefangen bei MED32) benannt werden. Paraloge im selben Organismus erhalten keine eigene Nummer, sondern werden als MEDxx-like (MEDxxL) bezeichnet. Ausgenommen von dieser neuen Nomenklatur sind die CDK-Cyclin-Paare des Kinase-Moduls, die aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität hinreichend bekannt sind. Für sie existiert keine unübersichtliche Vielzahl von Benennungen, weshalb sie auch unter Beibehaltung der bisherigen Namen in der Literatur gut zu identifizieren sind [33].

Modularer Aufbau und Dynamik der Untereinheiten-Zusammensetzung

Abhängig von ihrer Position im Komplex werden die einzelnen Mediator-Untereinheiten vier strukturell bzw. funktionell verschiedenen Modulen zugeordnet (Abbildung 17): Kopf-Modul (*Head*), Mittel-Modul (*Middle*), Schwanz-Modul (*Tail*) und Kinase-Modul ^[264]. Ihre länglich gestreckte Form ermöglicht es der Untereinheit MED14 mit Untereinheiten aller drei Hauptmodule (Kopf, Mitte und Schwanz) zu interagieren und so als Rückgrat zu fungieren ^[233, 240, 283].

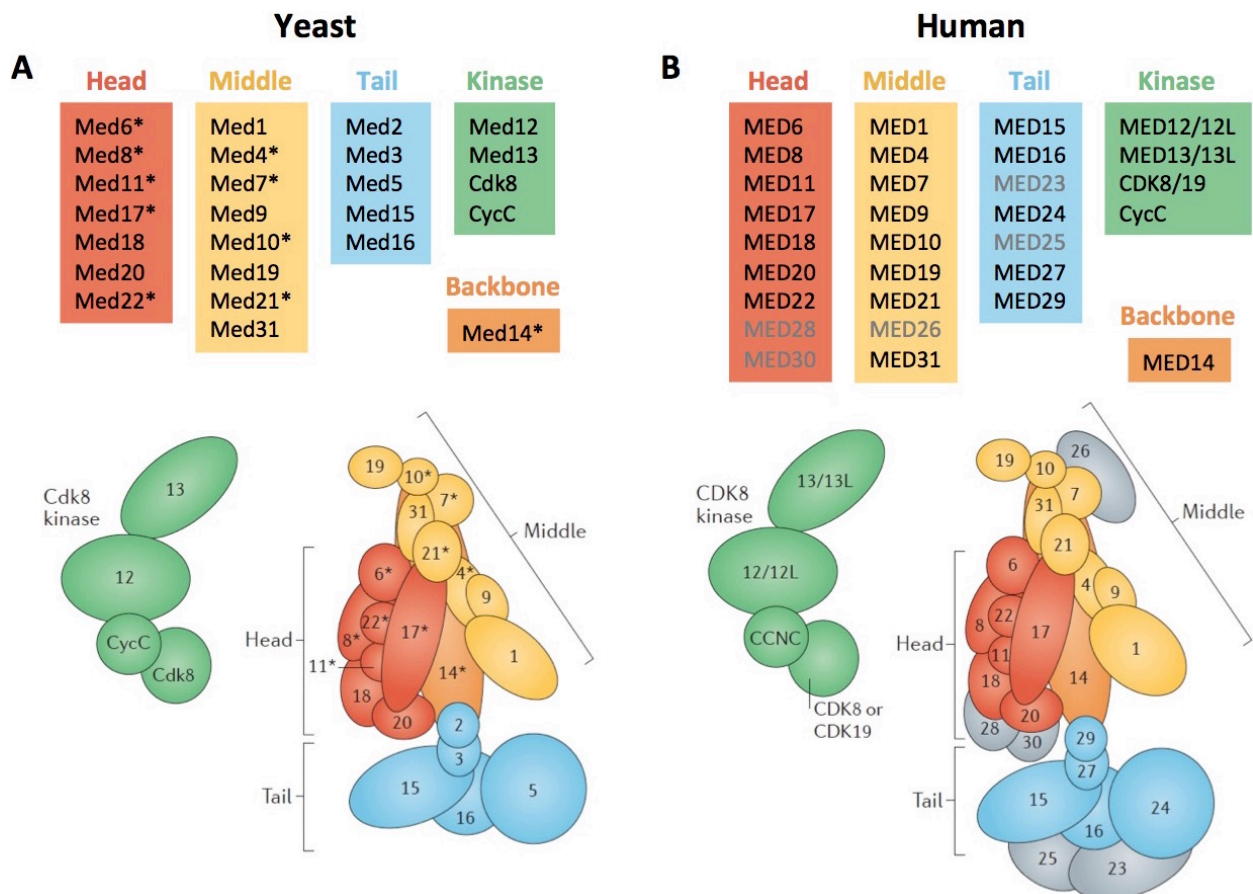


Abbildung 17: Modulare Architektur des Mediator-Komplexes. Organisation der Untereinheiten und modularer Aufbau (Schema) des Mediator-Komplexes in Hefe (A) und human (B) im Vergleich. Der Mediator-Komplex kann in vier Module unterteilt werden: Die Hauptmodule Head (rot), Middle (gelb), Tail (blau) und das Kinase-Modul (grün), das transient mit dem Komplex assoziiert. MED14 (orange) agiert als eine Art Rückgrat und verbindet die drei Hauptmodule (Head, Middle, Tail). Zehn der 25 Untereinheiten sind in der Hefe essentiell für das Überleben (mit Sternchen markiert). MED24, MED27 und MED29 (human) sind ortholog zu Med5, Med3 und Med2 (Hefe). Die Untereinheiten des Kinase-Moduls MED12, MED13 und CDK8 haben in Wirbeltieren Paralogue: MED12L (MED12-like), MED13L und CDK19, deren Bindung sich jeweils gegenseitig ausschließt ^[58]. Für die grau dargestellten Untereinheiten ist die genaue Lokalisation noch nicht zugewiesen, es ist daher lediglich ihre vermutliche Position dargestellt. Schemata (unterer Teil) aus Soutourina 2018 ^[264], oberer Teil ergänzt.

Die Untereinheiten-Zusammensetzung des Mediator-Komplexes unterliegt einer hohen Dynamik. So assoziiert das Kinase-Modul, bestehend aus MED12, MED13 und der Cyclin-abhängigen Kinase CDK8 mit ihrem Cyclin-Partner Cyclin C ^[32], lediglich transient mit dem Komplex ^[14]. Diese transiente Interaktion wird über die Untereinheit MED13 vermittelt ^[141] und führte dazu, dass für die Hauptmodule (Kopf, Mitte und Schwanz) lange Zeit die Bezeichnung „Kern-Mediator“ gebräuchlich war. Allerdings wurde eine Neudefinition des Kern-Mediators vorgeschlagen, basierend auf der Notwendigkeit der einzelnen Untereinheiten für einen *in vitro* funktionellen Mediator-Komplex ^[119]. Nach dieser Definition bilden die Untereinheiten des *Head*-Moduls und des *Middle*-Moduls, unter Ausschluss von MED1 und MED26 (human auch MED9 und MED19), zusammen mit MED14 den Kern-Mediator.

Für drei der vier Untereinheiten des Kinase-Moduls (MED12, MED13 und CDK8) sind im humanen Mediator-Komplex Paraloge bekannt (MED12L, MED13L, CDK19), deren Vorkommen im Kinase-Modul sich allerdings jeweils gegenseitig ausschließt ^[58]. Wie bereits frühere Studien nahelegten, scheint die MED26-Untereinheit in der Mehrheit der Kinase-Modul enthaltenden Mediator-Komplexe abwesend zu sein ^[67, 220]. Beobachtungen von Daniels *et al.* aus dem Jahr 2013 ^[58] weisen darauf hin, dass MED26 abwesend ist, wenn das Kinase-Modul die MED13-Untereinheit enthält, wohingegen MED26 im Mediator-Komplex anwesend sein kann, wenn das Kinase-Modul stattdessen mit der Untereinheit MED13L vorliegt.

Strukturelle Flexibilität

Neben der Dynamik in der Untereinheiten-Zusammensetzung, weist der Mediator-Komplex eine hohe strukturelle Flexibilität auf. Tóth-Petróczy *et al.* fanden 2008 ^[280] mit computergestützten Analysen eine ungewöhnlich hohe Anzahl prognostizierter intrinsisch ungeordneter Regionen (IDR, *Intrinsically Disordered Region*) in mehreren Mediator-Untereinheiten, von denen einige experimentell oder strukturell bestätigt werden konnten. Trotz der relativ geringen Sequenzkonservierung zwischen *S. cerevisiae* und *H. sapiens* ähnelte sich die Platzierung der ungeordneten Regionen in diesen beiden Organismen. IDRs ermöglichen eine flexible Anpassung an unterschiedliche Bindungspartner, können strukturelle Übergänge zwischen verschiedenen Konformationen des Komplexes erleichtern und die Weiterleitung transkriptioneller Signale unterstützen.

Die Konformation des Mediator-Komplexes ist sehr flexibel und durchläuft bei der Bindung anderer Proteine teils dramatische Veränderungen. Dabei beschränken sich diese Verschiebungen häufig nicht nur auf die nähere Umgebung der Interaktionsoberfläche, sondern setzen sich allosterisch über den gesamten Mediator-Komplex fort. Verschiedene Transkriptionsfaktoren induzieren durch ihre Bindung unterschiedliche strukturelle Änderungen, die mit Auswirkungen auf die Funktion des Komplexes einhergehen können, z.B. durch die Ermöglichung neuer Interaktionen mit Co-Faktoren ^[13, 67].

Sowohl die Bindung des Kinase-Moduls an die Hauptmodule als auch die Interaktion des Mediators mit der RNA-Polymerase II führt zu ausgeprägten Konformationsänderungen des humanen Mediator-Komplexes. Wie in mehreren Studien und für verschiedene Spezies beobachtet wurde, schließen sich die Bindung des Kinase-Moduls und die Bindung der RNA-Polymerase II gegenseitig aus ^[72, 141, 197, 282]. Während in *S. pombe* durch das Kinase-Modul aufgrund überlappender Bindungsoberflächen eine direkte sterische Blockade für die Polymerase II-Interaktion entsteht ^[72], verdeckt das Kinase-Modul in *S. cerevisiae* eine Bindungsstelle der Polymerase II CTD ^[282]. Knuesel *et al.* postulierten 2009 ^[141] das Modell einer transkriptionellen Regulation durch den CDK8-Subkomplex des humanen Mediators. Demnach blockiert die Anwesenheit des Kinase-Moduls die Neurekrutierung der RNA-Polymerase II und verhindert somit die Reinitiation der Transkription (Anhang Abb. Z3). Da die Bindestelle der RNA-Polymerase II sowohl in *S. cerevisiae* als auch im humanen Mediator über 100 Å von der Bindungsoberfläche des Kinase-Moduls entfernt liegt, scheint die Blockade hier auf allosterische Weise durch die Induktion von Konformationsänderungen im Komplex vermittelt zu sein ^[141].

1.5.2 Funktionen des Mediator-Komplexes in der Transkription

Der Mediator-Komplex stellt eine Verbindung zwischen an regulativen Elementen (z. B. distalen Enhancern) gebundenen Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie am Promotor her ^[230]. Diverse Transkriptionsfaktoren interagieren über unterschiedliche Untereinheiten (besonders im Schwanz-Modul) mit dem Mediator ^[172] (Abbildung 18), was eine simultane Interaktion mehrerer Transkriptionsfaktoren oder Co-Regulatoren ermöglicht. Durch die Integration der Signale verschiedener Transkriptionsfaktoren und Co-Regulatoren, und deren Übermittlung an die RNA-Polymerase II übernimmt der Mediator-Komplex entscheidende Funktionen in der Transkriptionsregulation ^[264]. Der Mediator-Komplex kann an wichtigen Schritten über den gesamten Transkriptionszyklus hinweg unterstützend und regulierend eingreifen ^[119].

PIC-Formation

Der Mediator-Komplex unterstützt den Aufbau des Präinitiationskomplexes (PIC) durch Interaktionen mit den PIC-Komponenten TBP (Untereinheit von TFIID) ^[277], TFIIA ^[123], TFIIB ^[18], TFIIF ^[26], TFIIIE ^[74] und TFIIH ^[74], die deren Rekrutierung vereinfachen (Abbildung 18). Die Rekrutierung von TFIIB ist Mediator-abhängig und sowohl der Mediator-Komplex als auch TFIIB sind für die Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum PIC erforderlich ^[18]. Weiterhin wurde gezeigt, dass TFIID und Mediator kooperativ an Promotor-DNA binden ^[124]. Über eine Interaktion mit der C-terminalen Domäne der RPB1-Untereinheit erleichtert der Mediator-Komplex die Rekrutierung der Polymerase II ^[138, 197]. Dabei stabilisiert TFIIF die korrekte Orientierung der RNA-Polymerase II im Komplex ^[26].

Während die Interaktion von TFIIF mit der freien Form der RNA-Polymerase II ausgeschlossen ist, wenn diese die Untereinheit GDOWN1 (POLR2M) enthält, ermöglicht die Bindung des Mediator-Komplexes eine Assoziation von TFIIF mit GDOWN1-enthaltender Polymerase ^[122]. Die Hinderung der Polymerase-Rekrutierung durch die kompetitive Bindung von TFIIF und GDOWN1 wird somit aufgehoben und die PIC-Formation gefördert.

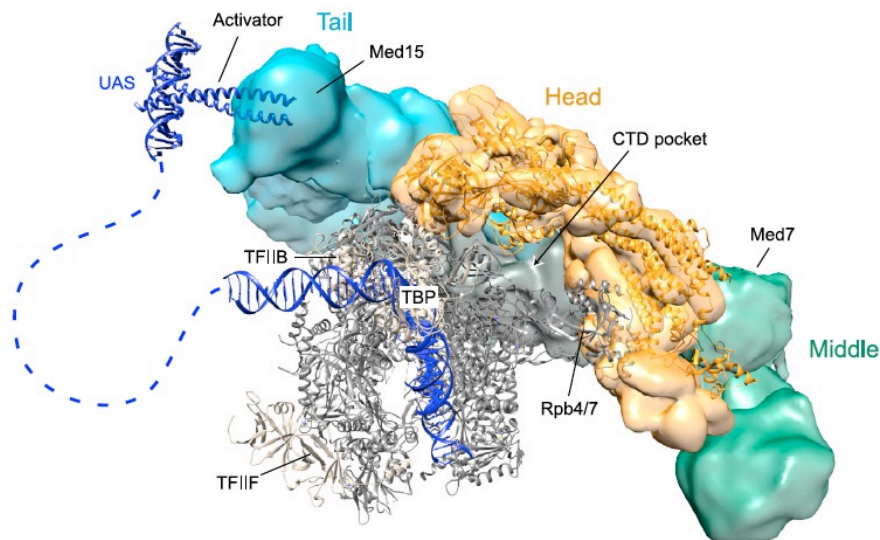


Abbildung 18: Modell der transienten Interaktion des Kern-Mediators mit dem PIC (Hefe). Transparente Oberflächen in blau (Schwanz), gold (Kopf) und grün (Mitte) zeigen die Position der Mediatormodule. Die generellen Transkriptionsfaktoren TBP, TFIIB und TFIIF sowie die RNA-Polymerase II Untereinheiten Rpb4/7 sind grau dargestellt. Der Mediator-Komplex tritt insbesondere mit der CTD der RNA-Polymerase II in Kontakt (siehe Markierung der CTD-Tasche). Während Kopf- und Mittel-Modul mit den PIC-Komponenten in Kontakt stehen, vermittelt das Schwanzmodul (in diesem Beispiel die Untereinheit MED15) die Interaktion zum am distalen regulativen Element (UAS) gebundenen Transkriptionsfaktor. Aus Jeronimo *et al.* 2016 ^[120] (weitere Quellen siehe dort).

Transkriptionsinitiation

Das Verlassen des Promotors durch die RNA-Polymerase II (*Pol II Release*) kennzeichnet den Übergang von der Initiation zur Elongation. In dieser Phase müssen die zuvor geknüpften Kontakte mit PIC-Komponenten und dem Mediator-Komplex unterbrochen werden. Die Phosphorylierung von Serin 5 der Pol II CTD durch die CDK7-Untereinheit von TFIIH übernimmt in diesem Vorgang eine Schlüsselrolle (1.4.2) ^[13]. Wie Kim *et al.* 1994 ^[138] zeigen konnten, stimuliert der Mediator-Komplex die CTD-Kinase-Aktivität von TFIIH und unterstützt somit während der Initiation die Unterbrechung seiner eigenen Kontakte mit der CTD der RNA-Polymerase II ^[118] um die Freigabe der Polymerase zu ermöglichen ^[304].

Das Kinase-Modul des Mediators kann die Transkriptionsinitiation hingegen in negativer Weise beeinflussen. So reprimiert die Phosphorylierung von CDK7 durch die Kinase CDK8 sowohl die Fähigkeit von TFIIH, die Transkription zu aktivieren als auch dessen CTD-Kinase-Aktivität ^[11].

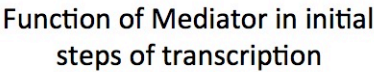
Pause-Release und Elongation

Der Mediator-Komplex interagiert mit mehreren Faktoren, die das Promotor-proximale Pausieren und den Übergang zur produktiven Elongation regulieren. Cheng *et al.* beobachteten 2012^[48], dass GDOWN1 (POLR2M) durch eine Inhibition der Terminationsaktivität von TTF2 (*transcription termination factor 2*), die Blockade der elongationsstimulierenden Funktion von TFIIF und die Beeinflussung von NELF und DSIF das Promotor-proximale Pausieren der RNA-Polymerase II zu stabilisieren scheint. Diese GDOWN1-vermittelte Blockade wird aufgehoben, indem der Mediator-Komplex die Funktion von TFIIF trotz der Anwesenheit von GDOWN1 ermöglicht^[48].

Zusätzlich trägt die Rekrutierung von P-TEFb als Komponente des SEC über die MED26-Untereinheit^[167, 268] oder, vermittelt durch eine Interaktion mit BRD4, über die MED1- bzw. MED23-Untereinheit^[119, 167] des Mediators zum Übergang von der Pause zur produktiven Elongation bei. Aufgrund der überlappenden Bindungsoberflächen von TFIID und SEC wurde postuliert, dass MED26 wie ein molekularer Schalter fungiert. Während MED26 zunächst mit TFIID im PIC interagiert, wird die Bindungsoberfläche nach der Initiation freigegeben, und MED26 kann mit Elongationsfaktoren assoziieren, um den Übergang in die Phase der produktiven Elongation zu vereinfachen^[268]. Donner *et al.* konnten 2010^[63] zeigen, dass auch das Kinase-Modul des Mediator-Komplexes zur Rekrutierung von P-TEFb und somit zum *Pause-Release* beiträgt. Die Cyclin-abhängige Kinase CDK8 des Kinase-Moduls phosphoryliert die Serine 2 und 5 der Polymerase II CTD. Somit kann das Kinase-Modul sowohl als positiver (Förderung der Elongation) als auch als negativer Regulator (Blockade der PolII Rekrutierung, repressive Phosphorylierung von CDK7) der Transkription agieren. Während die negativen Regulationsmechanismen bei der Initiation bzw. Reinitiation ansetzen, greifen die positiven Effekte zu einem späteren Zeitpunkt am Übergang zur produktiven Elongation. Anhand dieser Beobachtungen wäre ein Ablauf nach dem von Jeronimo und Robert 2017^[119] postulierten Modell denkbar, wonach das Kinase-Modul den Mediator-Komplex während der PIC-Formation verlässt und nach dem Verlassen des Promotors durch die Polymerase mit dem Mediator reassoziert um die Freigabe aus der Pause zu fördern (Abbildung 19, nächste Seite).

Reinitiation

Der Mediator-Komplex ist Teil des von Yudkovsky *et al.* 2000^[318] beschriebenen *Scaffold*-Komplexes, der nach der ersten Initiation am Promotor verbleibt. Wie bereits in Kapitel 1.4.5 geschildert, trägt der *Scaffold*-Komplex zu hohen Transkriptionsraten bei, indem die Notwendigkeit der erneuten Formation des PIC umgangen wird^[318]. Er ermöglicht so die schnellere Reinitiation nachfolgender Transkriptionsrunden durch die beschleunigte Rekrutierung weiterer Polymerase-Moleküle. Das Kinase-Modul kann regulierend in diesen Prozess eingreifen, indem es die Neurekrutierung der RNA-Polymerase II blockiert und so die Reinitiation der Transkription verhindert^[141] (Kapitel 1.5.1).



toren leitet den Übergang in die produktive Elongation ein. Modifiziert aus Jeronimo und Robert 2017 ^[119].

Termination und Gen-Looping

Wie Mukundan und Ansari 2013 ^[190] zeigen konnten, übernimmt die Untereinheit 18 des Mediator-Komplexes in Hefe eine wichtige Funktion bei der Termination der Transkription. Sie beobachteten weiterhin, dass diese Funktion von der Bildung von Gen-Loops zwischen dem Promotor und dem Terminator abhängig ist, die durch eine Interaktion des Mediators mit dem *Cleavage Factor* CF1 unterstützt wird ^[190]. Um Signale verschiedener Transkriptionsfaktoren verrechnen und an die basale Transkriptionsmaschinerie übermitteln zu können, agiert der Mediator-Komplex als Brücke zwischen distalen regulativen Elementen und dem Promotor. Dabei entstehen DNA-Loops, die sowohl Promotor und Enhancer als auch distale regulative Elemente untereinander in räumliche Nähe bringen ^[222]. Kagey *et al.* zeigten 2010 ^[129], dass der Mediator-Komplex mit Cohesin kooperiert um Enhancer-Promotor-Loops zu bilden. Cohesine können Ringstrukturen ausbilden, die zwei DNA-Segmente verbinden.

1.6 Projektskizze

1.6.1 Projekt-Hintergrund

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe ^[8] zeigten die strukturell verschiedenen PPAR β/δ inverse Agonisten ST247 und DG172 (erstmalig beschrieben von Lieber *et al.* 2012 (unsere AG) ^[158]) eine starke inhibitorische Wirkung auf die ANGPTL4-induzierte Krebszellinvasion *in vitro* (durch Repression der *ANGPTL4*-Transkription). Diese verhielt sich außerdem dominant gegenüber dem Einfluss aktivierender onkogener Signalwege wie beispielsweise dem TGF β -*Signaling* (*Transforming Growth Factor β*) ^[8].

Untersuchungen zum Mechanismus der verstärkten Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten lieferten überraschende Ergebnisse. Die bekannten Co-Repressoren NCoR/SMRT-Komplexe enthalten die katalytische Untereinheit HDAC3 (Kapitel 1.3.2). Jedoch führte die Inhibition von Klasse I und II Histon-Deacetylasen durch Trichostatin A (TSA) zwar zu einer Abschwächung der HDAC-vermittelten basalen Repression durch den unligierten Rezeptor, hatte aber keinen Effekt auf die verstärkte Repression durch den inversen Agonisten (Anhang, Abb. Z2) ^[8]. Das *Silencing* der kanonischen Co-Repressoren NCoR1, NCoR2 (SMRT) und SHARP mittels RNA-Interferenz ergab ein vergleichbares Muster: Die basale Repression wurde durch das *Silencing* der bekannten Repressoren (bereits bei NCoR1 alleine) aufgehoben, während die ST247-vermittelte Repression unbeeinträchtigt blieb (Anhang Abb. Z2) ^[8]. Diese Beobachtungen sind deutliche Hinweise darauf, dass die verstärkte Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten unabhängig von NCoR/SMRT-HDAC3 Komplexen ist und sich somit funktionell vom kanonischen Repressionsmechanismus des unligierten Kernrezeptors unterscheidet ^[8].

1.6.2 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten. In diesem Zusammenhang ist ein zentrales Ziel die Identifikation von Co-Repressoren, die von PPAR β/δ durch die Bindung des inversen Agonisten PT-S264 rekrutiert werden. Dies soll durch ChIP-MS basierte (Chromatin-Immunpräzipitation gefolgt von Massenspektrometrie) Interaktom-Analysen in MDA-MB231-*luc2* Zellen nach der Behandlung mit dem inversen Agonisten PT-S264 bzw. dem Agonisten L165,041 (Strukturen siehe Anhang, Abb. Z6) erreicht werden. MDA-MB231-*luc2* Zellen zeigten in früheren Experimenten eine besonders starke Regulation des PPAR β/δ -Zielgens *ANGPTL4* (Typ II) durch inverse Agonisten. Zur Validierung einzelner Kandidaten werden nach der Behandlung der Zellen mit Liganden Chromatin-Immunpräzipitationen gefolgt von quantitativen PCR-Messungen (ChIP-

qPCR) durchgeführt. Sofern die Rekrutierung eines Kandidaten als spezifisch für die Behandlung mit dem inversen Agonisten bestätigt werden kann, sollen unterschiedliche Ansätze zum Nachweis eines funktionellen Zusammenhangs mit dem Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten unternommen werden. Ein Beispiel für einen solchen Ansatz wäre der CRISPR-Cas9 vermittelte *Knockout* des potentiellen Co-Repressors oder die Verwendung von Inhibitoren gegen eine etwaige enzymatische Aktivität.

Um Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus ziehen zu können, soll eingegrenzt werden, an welchem Schritt des Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II die Repression angreift. Hierzu sollen Chromatin-Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen generelle Transkriptionsfaktoren, die Polymerase II und Mediator-Untereinheiten durchgeführt werden. Eine Untersuchung des Polymerase II Besatzes über den gesamten Genkörper des Modell-Locus *ANGPTL4* hinweg soll, anhand eines *Scanning*-ChIP Ansatzes, Hinweise auf die betroffene Phase der Transkription liefern. Auf gleiche Weise soll eine Beeinträchtigung der Phosphorylierungen von Serin 2 und Serin 5 der RNA-Polymerase II CTD untersucht werden. Die Erkenntnisse werden anschließend durch die Betrachtung der zum Transkriptionsstart rekrutierten generellen Transkriptionsfaktoren und Mediator-Untereinheiten vertieft.

Ein weiteres zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifikation von für den Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten wichtigen Interaktionsoberflächen des Kernrezeptors. Während der eigenen Masterarbeit ^[155] konnte erfolgreich ein *Knockout* von *PPARD* (für PPAR β/δ kodierendes Gen) in der Brustkrebszelllinie MDA-MB231-*luc2* generiert werden. Diese Zelllinie zeigt im Gegensatz zu den zuvor bereits verfügbaren *PPARD* KO Zellen (HCT116 und MCF7) eine ausreichende Ligandenresponsivität für die Durchführung eines funktionellen Screens. In den Jahren vor dem Beginn dieser Doktorarbeit wurden von Kollegen der AG Müller bereits zahlreiche Mutanten von PPAR β/δ kloniert. Zusätzlich werden einige neue Mutanten im Verlauf dieser Arbeit selbst hergestellt. Im darauffolgenden Schritt sollen mittels retroviraler Rekonstitution der MDA-MB231-*luc2* *PPARD* KO Zellen (Klon 2B3 ^[155]) diese PPAR β/δ Mutanten in einem funktionellen Screen auf eine Beeinträchtigung der transkriptionellen Regulation durch PPAR β/δ untersucht werden. Als Modell-Gen dient das besonders stark durch Liganden regulierte Zielgen *ANGPTL4*, dessen Transkriptlevel nach einer Behandlung mit Liganden mittels RT-qPCR (Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion) gemessen wird. Dabei werden die drei Regulationstypen basale Repression (anhand des basalen Transkriptlevels), Aktivierung durch einen Agonisten (nach der Behandlung mit L165,041) und verstärkte Repression durch einen inversen Agonisten (nach der Behandlung mit PT-S264) betrachtet. In Ermangelung einer Kristallstruktur von PPAR β/δ mit inversem Agonisten sollen die Ergebnisse anhand der Kristallstrukturen von PPAR α mit dem Agonisten GW409544 (PDB ID: 1K7L) und dem inversen Agonisten GW6471 (PDB ID: 1KKQ) interpretiert werden (Strukturen der Liganden siehe Anhang, Abb. Z6).

2 Materialien

2.1 Geräte

Allgemeines

- | | |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| • Autoklav Systec DX-65 | Systec, Linden |
| • Autoklav Systec VX-150 | Systec, Linden |
| • Bunsenbrenner | Camping Gaz, Hattersheim |
| • Flockeneisbereiter AF80 | Scotsman Ice Systems, Vernon Hills (USA) |
| • Mikrowellengerät NN-E245W | Panasonic, Kadoma (Japan) |
| • Nalgene® Mr. Frosty™ Gefrierbehälter | Nalgene, Rochester (USA) |
| • Neubauer-improved Zählkammer | Marienfeld superior, Lauda-Königshofen |
| • pH-Meter inoLab® pH720 | WTW, Weilheim |
| • Wasseraufbereitungssystem Barnstead™ GenPure™ Pro UV | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |

Brutschränke & Inkubatoren

- | | |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| • CO ₂ Inkubator HERACELL 240i | Heraeus, Hanau |
| • HERAtherm™ Mikrobiol. Inkubator IGS100 | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| • Inkubationsschüttler AJ112 | INFORS HT, Bottmingen (Schweiz) |

Elektrophorese- & Elektroimmunoblotkammern

- | | |
|----------------------------------------|-------------------------------------|
| • Mini Blot Tankblotkammer | Harnischmacher Labortechnik, Kassel |
| • PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin M | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| • PerfectBlue™ Gelsystem Mini S, M | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| • PerfectBlue™ Semi-Dry Blotter | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |

Geldokumentation Agarose-Gele & Western Blot Detektion

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------------|
| • ChemiDoc™ MP Imaging System | Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA) |
| • Gel iX Imager Geldokumentation | Intas Science Imaging Instr., Göttingen |
| • Geldokumentation Drucker P-93W | Mitsubishi Electric, Tokio (Japan) |

Heizbäder & -blöcke

- | | |
|-----------------------------------------|------------------------------------|
| • Heizblock AccuBlock™ Digital Dry Bath | Labnet International, Edison (USA) |
| • Inkubationsbad GFL 1002 | GFL, Burgwedel |

Kühlgeräte zur Probenlagerung

- | | |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| • Gefrierschrank GGU 1500 Premium | Liebherr-Internat., Biberach an der Riß |
| • Kühlschranks MediLine FKUv 1610 | Liebherr-Internat., Biberach an der Riß |
| • Kühl-Gefrierkombi MediLine LCexv 4010 | Liebherr-Internat., Biberach an der Riß |
| • Stickstoffbehälter APOLLO® Biosafe® | Cryotherm, Kirchen/ Sieg |
| • Stickstofftank CHRONOS® Biosafe® | Messer, Griesheim |
| • V.I.P.® Series Ultra Low Fr. MDF-U55V | SANYO Electric, Moriguchi (Japan) |

Mikroskope

- | | |
|------------------------------------------|-----------------------------|
| • Inverses Labormikroskop DM IL LED | Leica Microsystems, Wetzlar |
| • konf. Fluoreszenzmikroskop DM IRE2/SP2 | Leica Microsystems, Wetzlar |

Netzteile für Elektrophorese und Elektroimmunoblot

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| • Power Supply Consort EV261 | BIOTEC-FISCHER, Reiskirchen |
| • Power Supply Consort EV3610 | BIOTEC-FISCHER, Reiskirchen |
| • Power Supply BioRad 200/2.0 | Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA) |

PCR-Maschinen

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------------|
| • Mx3005P qPCR System | Agilent Technologies, Santa Clara (USA) |
| • Peqstar 96x Universal Gradient | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |

Pipetten & Pipettierhilfen

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| • Pipetboy Pipetus® Standard | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| • Pipettierhelfer PIPETBOY 2 | INTEGRA, Zizers (Schweiz) |
| • Pipettensatz Research® plus | Eppendorf, Hamburg |

Schüttler, Mischer & Rührer

- | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| • Digitaler Diskmischer RS-RD 20 | Phoenix Instrument, Garbsen |
| • ELMI Intelli-Mixer RM-2 | ELMI, Riga (Lettland) |
| • Magnetrührer MR Hei-Mix L | Heidolph, Schwabach |
| • Vortexer REAX2000 | Heidolph, Schwabach |
| • Wippschüttler ST 5 | CAT Ingenieurbüro Zipperer, Staufen |

Sonifizierung für Chromatin-Immunpräzipitation

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| • Benchtop 15 ml Tube Cooler | Active Motif, Carlsbad (USA) |
| • Converter 102-C | Branson Ultrasonics, Danbury (USA) |
| • Gehörschutz Peltor® Optime III | 3M Deutschland, Neuss |
| • Sonifizierer Digital Sonifier™ | Branson Ultrasonics, Danbury (USA) |
| • Sonifizierungsplattform EpiShear™ | Active Motif, Carlsbad (USA) |

Spektrophotometer

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| • NanoDrop™ 1000, 2000 | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| • SpectraMAX 340 Microplate Reader | MWG-Biotec, Ebersberg |

Sterilbänke & Abzüge

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------|
| • MSC-Advantage™ Sterilbank | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| • PCR Workstation Pro | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| • Laborabzug DELTA 30 | Wesemann, Syke |

Vakuumsysteme

- | | |
|-----------------------------------|----------------------|
| • Chemie-Vakuumsystem MZ 2C NT | Vacuubrand, Wertheim |
| • BioChem-VacuuCenter BVC control | Vacuubrand, Wertheim |
| • HLC Kompaktabsaugsystem | DITABIS, Pforzheim |
| • QIAvac 24 Plus | QIAGEN, Hilden |

Waagen

- | | |
|--------------------------------|-----------------------|
| • Analysewaage KERN ABT120-5DM | Kern & Sohn, Balingen |
| • Präzisionswaage KERN 572 | Kern & Sohn, Balingen |

Zentrifugen

- | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| • Heraeus™ pico™ 17 Mikrozentrifuge | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| • High Performance C. Avanti® J-26XP | Beckman Coulter, Brea (USA) |
| • Micro Centrifuge LLG-uniCFUGE 2 | LLG Labware, Meckenheim |
| • Multifuge® 3 L-R | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| • Kühlzentrifuge Allegra® X-15R | Beckman Coulter, Brea (USA) |
| • Kühlzentrifuge Heraeus™ fresco™ 17 | Thermo Scientific, Waltham (USA) |

2.2 Verbrauchsmaterialien

Bakterienkulturgefäße & Zubehör für Plasmidpräparationen

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| • Chirurgische Einwegskalpelle | B. Braun, Melsungen |
| • Eindrückstopfen, farblos | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Parafilm® M | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| • Petrischalen | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Polypropylen-Röhrchen (12 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| • Polypropylen-Röhrchen (14 ml) | SARSTEDT, Nümbrecht |

Laborhandschuhe

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| • Sempercare® premium Latex | Semperit, Wien (Österreich) |
| • Sempercare® Nitril | Semperit, Wien (Österreich) |

Pasteurpipetten & Pipettenspitzen

- | | |
|----------------------------------------------|-----------------------------------|
| • Filter-Pipettenspitzen, Biosphere 1000 µl | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Filter-Pipettenspitzen, premium surface | nerbe plus, Winsen/ Luhe |
| • Filter-Pipettenspitzen, SurPhob® | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| • Pasteurpipetten | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| • Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Tip StackPacks (10 µl, 200 µl) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Qualitätspipettenspitzen 1000 µl | SARSTEDT, Nümbrecht |

Microtest-Platten, PCR-Platten & Verschlussfolien

- | | |
|-----------------------------------------|----------------------------------|
| • 96-well PCR-Platte 0,2 ml non-skirted | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| • Adhäsive PCR-Verschlussfolie | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| • Microtest Plate 96-well, Flat Bottom | SARSTEDT, Nümbrecht |

Reagiergefäße und Schraubröhren

- | | |
|-----------------------------------------------|---------------------|
| • Eppendorf DNA LoBind Tubes 1.5 ml | Eppendorf, Hamburg |
| • Eppendorf Tubes 5.0 ml | Eppendorf, Hamburg |
| • PCR-Gefäße Multiply®-Pro (0,2 ml, 0,5 ml) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Reagiergefäße SafeSeal (1,5 ml, 2 ml, 5 ml) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Schraubröhren (15 ml, 50 ml) | SARSTEDT, Nümbrecht |

Sterilfiltrationsmaterial

- | | |
|--------------------------------------------|------------------------------|
| • Einmalkanülen Sterican® | B. Braun, Melsungen |
| • Einmalspritzen HSW NORM-JECT® | Henke-Sass, Wolf, Tuttlingen |
| • Millex spritzenbetriebene Filter 0,22 µm | Merck Millipore, Darmstadt |

Western Blot Material

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| • Immobilon®-P PVDF Membran | Merck Millipore, Darmstadt |
| • Whatman-Paper | Schleicher & Schuell, Einbeck |

Zellkulturgefäße & Zellschaber

- | | |
|----------------------------------------------|---------------------|
| • Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 15 cm) | SARSTEDT, Nümbrecht |
| • Zellschaber 2-Pos. Klinge (25 cm, 39 cm) | SARSTEDT, Nümbrecht |

2.3 Reagenzien

2.3.1 PPAR-Liganden, sonstige Stoffe & Chemikalien

PPAR-Liganden

Sämtliche PPAR-Liganden wurden in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst.

(Strukturen siehe Anhang Abb. Z6)

Name	Ligandentyp	Konzentration	Hersteller	Katalog-Nr.
L-165,041	PPAR β/δ -Agonist	1 mM	Tocris	1856
PT-S264	inverser PPAR β/δ Agonist	300 μ M	AK Diederich	[279]
ST247	inverser PPAR β/δ Agonist	300 μ M	AK Diederich	[202]

Tabelle 2: PPAR-Liganden zur Behandlung von Zellen

Sonstige Stoffe zur Behandlung von Zellen

Name	Konzentration	Lösungsmittel	Hersteller	Katalog-Nr.
Apicidin	250 μ M	DMSO	AppliChem	A7861
DRB	50 mM	DMSO	Cayman	10010302
Flavopiridol	1 mM	DMSO	Cayman	10009197
TGF β_1 (<i>human platelets</i>)*	1 μ g/ml	0,1 % BSA/PBS	Merck	616450
TGF β_2 (<i>porcine platelets</i>)*	1 μ g/ml	0,1 % BSA/PBS	Sigma	T5300
Trichostatin A	500 μ M	DMSO	AppliChem	A7812
Triptolid	1 mM	DMSO	Cayman	11973

Tabelle 3: weitere Stoffe zur Behandlung von Zellen

* In frühen Experimenten wurde TGF β_2 als aktivierender Stimulus der *ANGPTL4* Transkription für die Behandlung der Zellen eingesetzt. Inkonsistenzen in der Qualität des verwendeten TGF β_2 machten jedoch zwischenzeitlich einen Umstieg auf TGF β_1 erforderlich. Hinsichtlich der Effektstärke auf das *ANGPTL4*-Transkriptlevel konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Sonstige Chemikalien & Reagenzien

Alle weiteren Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

2.3.2 Puffer und Lösungen

Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegellösung	0,5-2,0 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer
DNA-/ RNA-Farbstoff Midori Green Advance	1:25.000 eingesetzt (Biozym, 617004) Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt
Ethidiumbromid	10 mg/ml in Wasser (Carl Roth, 2218.1) 1:25.000 eingesetzt Lagerung lichtgeschützt
Nukleinsäuren-Gel-Färbemittel GelRed™	10.000x in Wasser (Biotium, 41003) 1:25.000 eingesetzt Lagerung lichtgeschützt
50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA Puffer)	2 M Tris 1 M Eisessig 50 mM EDTA pH 7,8 ad 1 l H ₂ O
1x TAE-Puffer	20 ml 50x TAE-Puffer ad 1 l H ₂ O
6x Orange Loading Dye	Thermo Fisher, R0631 Farbstoffe: Orange G, Xylene Cyanol FF

ChIP-qPCR

Protease-Inhibitorgemisch (Sigma, P8340)	104 mM AEBSF 80 µM Aprotinin 4 mM Bestatin 1,4 mM E-64 2 mM Leupeptin 1,5 mM Pepstatin A Lagerung -20 °C (Aliquots, in DMSO) 1: 1000 einzusetzen in Lysepuffer I und II
------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Protein A Sepharose, Protein G Sepharose	Lagerung in 20 % Ethanol bei 4 °C (GE Healthcare)
UltraPure™ BSA	20 g/l, gelöst in TE, pH 8.0 Lagerung bei -20°C
UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution	10 mg/ml (Invitrogen, 15632-011) Lagerung bei -20°C
Lysepuffer I (hypotoner Lysepuffer)	5 mM PIPES, pH 8,0 85 mM KCl 0,5 % (v/v) NP40 Lagerung bei 4 °C (Langzeit: Aliquots -20 °C)
Lysepuffer II (RIPA-Puffer)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % (v/v) NP40 1 % (w/v) Natriumdeoxycholat 0,1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA Lagerung bei 4 °C (Langzeit: Aliquots -20 °C)
Waschpuffer I (<i>mixed micelle buffer</i>)	20 mM Tris, pH 8,1 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) SDS 2 mM EDTA Lagerung bei 4 °C
Waschpuffer II (Puffer 500)	20 mM Tris, pH 8,1 500 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) SDS 2 mM EDTA Lagerung bei 4 °C
Waschpuffer III (LiCl-Detergenz Puffer)	10 mM Tris, pH 8,1 250 mM LiCl 1 % (v/v) NP40 1 % (w/v) Natriumdeoxycholat

	1 mM EDTA Lagerung bei 4 °C
Elutionspuffer	1 % (w/v) SDS 100 mM NaHCO ₃ zur Verwendung frisch ansetzen
Reversionsmix (pro Probe)	16 µl 5 M NaCl 16 µl 1 M Tris pH 6,8 8 µl 0,5 M EDTA 1 µl RNase A (10 g/l Stock) 1 µl Proteinase K (20 g/l Stock) zur Verwendung frisch ansetzen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

5x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 250 mM DTT 50 % (v/v) Glycerin 5 % (w/v) SDS 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
RIPA-Puffer (für Gesamtzelllysate)	siehe ChIP-Lysepuffer II
Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)	10 % (w/v) in H ₂ O
Sammelgellösung 4 %	188 mM Tris-HCl, pH 6,8 4 % Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung 0,1 % (w/v) SDS (1: 100 aus 10 % Stocklsg.) zum Start der Polymerisation zugeben: 0,1 % (w/v) APS (1: 100 aus 10 % Stocklsg.) 0,1 % (w/v) TEMED
Trenngellösung 0 % bzw. 20 % (Herstellung der gewünschten Trenngel- konzentration durch Mischung der 0 % und 20 % Lösung im passenden Verhältnis)	375 mM Tris-HCl, pH 8,9 0 bzw. 20 % Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung 0,1 % (w/v) SDS (1: 100 aus 10 % Stocklsg.) zum Start der Polymerisation zugeben: 0,1 % (w/v) APS (1: 100 aus 10 % Stocklsg.) 0,1 % (v/v) TEMED

5x SDS-Laufpuffer	500 mM Tris 1,92 M Glycin 0,5 % (w/v) SDS Lagerung bei 4 °C
1x SDS-Laufpuffer	200 ml 5x SDS-Laufpuffer ad 1 l H ₂ O

Western Blot

10x TBST-Puffer	500 mM Tris-HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl 1 % Tween 20
1x TBST _{0,1} -Puffer	100 ml 10x TBST-Puffer ad 1 l H ₂ O
10x Transferpuffer Tankblot	250 mM Tris 1,7 M Glycin 0,25 % (w/v) SDS pH 8,0 Lagerung bei 4 °C
1x Transferpuffer Tankblot	100 ml 10x Transferpuffer Tankblot 50-150 ml Methanol ad 1 l H ₂ O Lagerung bei 4 °C
10x Transferpuffer Halbtrockenblot (Towbin)	250 mM Tris 1,92 M Glycin pH 8,0-8,5 Lagerung bei 4 °C
1x Transferpuffer Halbtrockenblot (Towbin)	100 ml 10x Transferpuffer Halbtrockenblot 100 ml Methanol ad 1 l H ₂ O

2.3.3 Medien und sonstiges für die Bakterien- & Zellkultur

Bakterienkulturmedien

LB-Medium (Luria Broth Medium)	1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % NaCl pH 7,5 (eingestellt mit NaOH), autoklaviert Lagerung bei 4 °C
LB-Agar	1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium (s.o.) autoklaviert, Lagerung bei 4 °C

Selektionsantibiotika

Name	Einsatzgebiet	Konzentration	Lösungsm.	Hersteller	Katalog-Nr.
Ampicillin	Bakterienkultur	100 mg/ml	Wasser	Ratiopharm	2036628
Blasticidin S	Zellkultur	10 mg/ml	Wasser	Fisher Sc.	10648203
G418	Zellkultur	50 mg/ml	DMEM	Santa Cruz	29065B
Hygromycin B	Zellkultur	45-60 µg/ml	Wasser	Sigma	H0654

Tabelle 4: Verwendete Selektionsantibiotika

Zellkulturmedien & Zusätze

Sowohl die Grundmedien als auch das PBS für die Zellkultur wurden von der Firma Life Technologies (Gibco®), Carlsbad (USA) bezogen. Für den Einsatz in der Zellkultur wurden die Medien standardmäßig mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt.

Medien & PBS

- Gibco® Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), ohne Ca, ohne Mg, 14190169
- Gibco® Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, pyruvate, 41966052
- Gibco® McCoy's 5A Medium, 26600080
- Gibco® OptiMEM™ Reduced Serum Medium, GlutaMAX™, 51985026

Mediumszusätze & Trypsin

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| • Fötale Kälberserum (FCS), F7524 | Sigma, St. Louis (USA), Lot: 013M3396 |
| • Fötale Kälberserum (FCS), LE-12A | Capricorn, Ebsdorfergrund |
| • Penicillin/Streptomycin 100x, P0781 | Sigma, St. Louis (USA) |
| • 0,05% Trypsin-EDTA (1x), phenol red | Life Technologies (Gibco®), Carlsbad (USA) |

2.3.4 Enzyme & Molekulargewichtsstandards

Sämtliche Enzyme wurden mit den jeweils vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen verwendet.

Protein- & Molekulargewichtsstandards

- | | |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| • GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| • GeneRuler™ Low Range DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| • PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |

Enzyme

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------------------|
| • Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuklease | Integrated DNA Technologies, San José (USA) |
| • Antarktische Phosphatase | New England BioLabs, Ipswich (USA) |
| • Proteinase K | Bioline, London (Großbritannien) |
| • Q5® High Fidelity DNA Polymerase | New England BioLabs, Ipswich (USA) |
| • Restriktionsenzyme | New England BioLabs, Ipswich (USA) |
| • RNase A | Macherey-Nagel, Düren |
| • T4 Ligase, HC | Thermo Scientific, Waltham (USA) |

2.3.5 Kits**CRISPR**

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------------------|
| • Alt-R® CRISPR-Cas9 Control Kit | Integrated DNA Technologies, San José (USA) |
|----------------------------------|---------------------------------------------|

PCR & quantitative PCR

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| • Absolute qPCR SYBR Green Mix (2x) | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| • ImmoMix™ Red | Bioline, Luckenwalde |
| • Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit | New England BioLabs, Ipswich (USA) |

Plasmidpräparation und DNA-Aufreinigung

- NucleoBond® Xtra Midi Macherey-Nagel, Düren
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Macherey-Nagel, Düren
- QIAquick® PCR Purification Kit QIAGEN, Hilden

Proteinmessung & Western Blot

- DC™ Protein Assay Kit II Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
- Luminata™ Forte Western HRP Substrat Merck Millipore, Darmstadt

RNA-Isolation & Reverse Transkription

- iScript™ cDNA Synthesis Kit BioRad Laboratories, Hercules (USA)
- NucleoSpin® RNA II Macherey-Nagel, Düren

Transfektion

- Lipofectamine® 2000 Thermo Scientific, Waltham (USA)

2.4 Antikörper & Nukleinsäuren

2.4.1 Antikörper

Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP)

Antikörper	Hersteller	Spezies	Klonalität	Katalog-Nr.	RRID
α -HDAC3	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-11417	AB_2118706
IgG	Sigma	Kaninchen	polyklonal	I5006	AB_1163659
α -MED1	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-8998	AB_2144021
α -MED13L	Bethyl	Kaninchen	polyklonal	A302-420A	AB_1907303
α -MED26 (CRSP70)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-48776	AB_782277
α -NCoR	Abcam	Kaninchen	polyklonal	ab24552	AB_2149005
α -NCoR	Bethyl	Kaninchen	polyklonal	A301-145A	AB_873085
α -PPAR α (H-98)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-9000	AB_2165737
α -PPAR β/δ (H-74)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-7197	AB_2268420
α -PPAR γ (H-100)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-7196	AB_654710
α -RPB1 CTD (RNAPII)	Biolegend	Maus	monoklonal	8WG16	AB_2565554
α -RPB1 CTD unsphos.	Ascenion	Ratte	monoklonal	1C7	AB_2631402
α -RPB1 CTD Ser2-P	Ascenion	Ratte	monoklonal	3E10	AB_2631403
α -RPB1 CTD Ser5-P	Ascenion	Ratte	monoklonal	3E8	AB_2631404
α -RPB1 NTD (RNAPII)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-899	AB_632359
α -RPB1 NTD (RNAPII)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-9001	AB_2268548
α -RXR (Δ N 197)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-774	AB_2270041
α -SMRT (NCoR2)	Abcam	Kaninchen	polyklonal	ab24551	AB_2149134
α -TBLR1	Novus	Kaninchen	polyklonal	NB600-270	AB_10001343
α -TBP (TFIID)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-273	AB_2200059
α -TFIIA	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-25365	AB_2116529
α -TFIIB (C-18)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-225	AB_2114380
α -TFIIH	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-293	AB_2262177

Tabelle 5: ChIP-qPCR Antikörper

Western Blot

Antikörper	Hersteller	Spezies	Klonalität	Katalog-Nr.	RRID
Primärantikörper					
α -FLAG [®] M2	Sigma	Maus	monoklonal	F1804	AB_262044
α -Lamin B (M20)	Santa Cruz	Ziege	polyklonal	sc-6217	AB_648158
α -LDH (H-160)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-33781	AB_2134947
α -NCoR	Th. Fisher	Kaninchen	polyklonal	PA1-844A	AB_2149004
α -PPAR α (H-98)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-9000	AB_2165737
α -PPAR β/δ (F-10)	Santa Cruz	Maus	monoklonal	sc-74517	AB_1128604
α -PPAR γ (H-100)	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	sc-7196	AB_654710
Sekundärantikörper					
α -goat IgG, HRP-linked	Santa Cruz	Esel		sc-2020	AB_631728
α -mouse IgG, HRP-linked	CST	Pferd		7076	AB_330924
α -rabbit IgG, HRP-linked	CST	Ziege		7074	AB_2099233

Tabelle 6: Western Blot Antikörper

2.4.2 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung

Alle Primer wurden von der Firma Sigma Aldrich synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Mit destilliertem Wasser wurden die Oligonukleotide auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt und anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

ChIP-qPCR Primer

genomische Region	forward Sequenz (5'-3')	reverse Sequenz (5'-3')
ABCA1 PPRE (-64.000)	GTCGCAAAGTAGGTGA	AAGTGCAGACTTGGAGAACTTG
ABCA1 TSS	GAGAACCGGCTCTGTTGGT	AATTGCGAGCGAGAGTGAGT
ANGPTL4 -8.500	CTTTCAGGGACCGACTTGAG	TTGTACATTGCAGGGCAGAC
ANGPTL4 -700	AGGCAAGGACTTTTGGTGAG	GGAAGGAGGGAAAGAAAGG
ANGPTL4 -500	CTTTTTCCGTCCTTCCTTCC	GCGACAGAGCCAGAGTACG
ANGPTL4 -275	CGGGCTGGTCTGGAAGTC	GCCCGCTCTAGTGTGAA
ANGPTL4 TSS	TCCGCACCCAACCTATAAAAC	GGATCACAGTCGTGTGAGGAT
ANGPTL4 +250	CCTAAGAGGATGAGCGGTGCT	TCGTCCCAGGACGCAAAG
ANGPTL4 +300	CACCGCCGTGCTACTGAG	GCCAGGACATTCATCTCGTC
ANGPTL4 +500	TCCACCGACCTCCCGTTAG	AACCAGCCCTGGGGACAC

ANGPTL4 +750	AGGAATTCAAGACCACCTAAAGC	GTGTGTGTGTGTGTAGAAGAGACG
ANGPTL4 +2.000	CGAATTCAGCATCTGCAAAG	GAGGGACCTTTTCTCCCTTG
ANGPTL4 PPREs (+3.500)	CCCAGAGTGACCAGGAAGAC	CCTTACTGGATGGGAGGAAAG
ANGPTL4 +5.000	TAGGCAGATGGCAGAGAGGT	ACAGTGGATGACCAGGGAAG
ANGPTL4 +7.000	ACGATGGCTCAGTGGACTTC	CTGCCTCTGTCCCCACTAGA
ANGPTL4 +10.200	TGGTGTCTGTTGTGTGTAGGTC	GCTTTTATTCCAAGAACTCTGTGAG
PDK4 PPREs (-12.200)	GCAGAGTCAACAAGGGGAAG	ACTAGATGCCTGGGAGCTGA
PDK4 (TSS)	GTCCCAAACAGGAGGAGTCA	CGGAGCCCATAGTTCTTTCTC
PDK4 -4.500 (Kontrollregion)	GTATGTGTACTGGGGGGAC	CAGATGGCTCTTTTCGTTCC
PLIN2 PPRE (-34.300)	CCAGTAAGCCTCTTAGCACCAC	TGCAACCTTTCACTTTGTGC
PLIN2 TSS	GACGGACTGCAGCGAAAG	GCGAGGCGGGGTTTATAG
TSC22D3 TSS	GCTGGAGTTGAAGGGAAGTG	AGGAGCCAAAATATCTCCGAGT

Tabelle 7: ChIP-qPCR Primer

Mutagenese Primer pMSCVbsd-PPARD

Mutation	forward Sequenz (5'-3')	reverse Sequenz (5'-3')	Template
V254A	TGCACCACAG <u>C</u> GGAGACCGTG	GCTGGCAGCGGTAGAAGAC	Wildtyp
V254R	GTGCACCACA <u>A</u> GGGAGACCGTGC	TGGCAGCGGTAGAAGACG	Wildtyp
T261R	CGGGAGCTCA <u>G</u> AGAGTTCCGCAAG	CACGGTCTCCACTGTGGT	Wildtyp
T261R-V279R	CGGGAGCTCA <u>G</u> AGAGTTCCGCAAG	CACGGTCTCCACTGTGGT	V279R
K283A	TACCCTTCTC <u>G</u> CGTATGGCGTGC	ACCTGGTCGTTGAGGAAG	Wildtyp
K322A	<u>C</u> ACCCTTCAGTGATATCATTTGAGCCTAAG	<u>C</u> GCGGAGGCTGCGCAG	Wildtyp
K322R	<u>G</u> ACCCTTCAGTGATATCATTTGAGCCTAAG	<u>T</u> GCGGAGGCTGCGCAG	Wildtyp
I420R	<u>G</u> AAGAAGACCGAAACCGAGACCTC	<u>C</u> TCCGCTGCATCATCTGGGC	Wildtyp
K421A	GCAGCGGATC <u>G</u> CCAAAGACCGAAACC	ATCATCTGGGCGTGCTCG	Wildtyp
K422A	GCGGATCAAG <u>G</u> CCACCGAAACCGAGAC	TGCATCATCTGGGCGTGC	Wildtyp
K421A-K422A	GCAGCGGATC <u>G</u> CCGCCACCGAAACCGAG	ATCATCTGGGCGTGCTCG	Wildtyp
K421R	CAGCGGATCA <u>G</u> GAAGACCGAAAC	CATCATCTGGGCGTGCTC	Wildtyp
K422R	CGGATCAAGA <u>G</u> GACCGAAACC	CTGCATCATCTGGGCGTG	Wildtyp
K421R-K422R	<u>A</u> GGACCGAAACCGAGACCTC	<u>C</u> TGATCCGCTGCATCATCTG	Wildtyp
T423A-T427D	CGAAACCGAG <u>G</u> ACTCGCTGCAC	GCCTTCTTGATCCGCTGC	T423A
T423D-T427A	CGAAACCGAG <u>G</u> CCTCGCTGCA	TCCTTCTTGATCCGCTGCATC	T423D
S428A	<u>G</u> CGCTGCACCCTCTGCTCC	GGTCTCGGTTTCGGTCTTCTTGATC	Wildtyp
H430K	GACCTCGCTG <u>A</u> GCCTCTGCTCC	TCGGTTTCGGTCTTCTTGATCC	Wildtyp
L433A	GCACCCTCTG <u>G</u> CCAGGAGATCTAC	AGCGAGGTCTCGGTTTCG	Wildtyp
E435A	CTGCTCCAGG <u>C</u> GATCTACAAGGAC	AGGGTGCAGCGAGGTCTC	Wildtyp
D439A	ATCTACAAGG <u>C</u> CATGTACTAACGGC	CTCCTGGAGCAGAGGGTG	Wildtyp
H413W-NCOR	GGTGACTGAA <u>T</u> GGGCACAGATGATGC	AACTGTCTGAAGATCTGCC	Fusionsk.

Tabelle 8: Mutagenese Primer pMSCVbsd-PPARD, unterstrichen sind jeweils die veränderten Codons

Sequenzierungsprimer

Primername	Sequenz	sequenzierte Plasmide/ DNA
NCOR1cDNAseq1fw	GGAGCAGAAACACCGCAGTATTG	pBABEhyg-, pcDNA3.1-NCOR1
NCOR1cDNAseq2fw	AGGCAGAAACCAGCAAATTGCTC	pBABEhyg-, pcDNA3.1-NCOR1
NCOR1cDNAseq3fw	GCAGTTCCAAGTACAAAACCAGCTG	pBABEhyg-, pcDNA3.1-NCOR1
NCOR1cDNAseq4fw	CTCCATCTCACAGGGAACACCAG	pBABEhyg-, pcDNA3.1-NCOR1
NCOR1cDNAseq5fw	CCCATACGAGCATTTGAAGGTGC	pBABEhyg-, pcDNA3.1-NCOR1
NCOR1cDNAseq6fw	CGCAATGGAGAACACAAGACAGAC	pBABEhyg-, pcDNA3.1-NCOR1
NCOR1cDNAseq7fw	AGGTGGAGAAGAGATCTGTTTCAGTG	pBABEhyg-, pcDNA3.1-NCOR1
NCOR1cDNAseq8fw	GAGCCCTACGAGCCCATCTC	pBABEhyg-, pcDNA3.1-NCOR1
NCOR1_F1zuF2_fw	CCGTGCGGAGATGATCAAAATGC	pMSCVbsd-PPARD-NCOR1
NCOR1_F2zuF3_fw	GCCAATGATGTTTGATGCCGAGC	pMSCVbsd-PPARD-NCOR1
NCOR1_F3neuzuF4_fw	GGGCTGCTATCGCAAAGATGG	pMSCVbsd-PPARD-NCOR1
NCOR1_F2neuzuF3_fw	CACCAATGATGTTTGATGCTGAGC	pMSCVbsd-PPARD-NCOR1
NCOR1_F3neuzuF4_fw	GTTGCGAAGAAAGGCCCTGTAGAG	pMSCVbsd-PPARD-NCOR1
NCOR1_F3neuzuF2_rv	AGGGACGCTTTTCCTCTCCAAG	pMSCVbsd-PPARD-NCOR1
pMSCVseqfw	CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC	pMSCVbsd
pMSCVseqrv	GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC	pMSCVbsd
PPARD3'seqfw	GGAGGCTATCCAGGACACCATC	pMSCVbsd-PPARD
SeqPPARDgRNA8_fw1	ACATCTTGTGGAGCTTGCGA	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA8_rv1	CCACCTGTGGGTTGTACTGG	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA8_fw2	TGTGGAGCTTGCGATCTGG	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA8_rv2	TTGTACTGGCTCCCCCTCGTT	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA9_fw1	AAACGAGGGGAGCCAGTACA	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA9_rv1	CTTGCCCTGCACCATGAAGTTG	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA9_fw2	ACGAGGGGAGCCAGTACAAC	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA9_rv2	CTGTGCTCCCCATGTCCCTT	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA10_fw1	CATAATCGGGCCCTTTGGCA	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA10_rv1	GGACCTTGGTTCAGGCTGT	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA10_fw2	CGTTACTTCCAAATGTCAGGAGT	PPARD genomische DNA
SeqPPARDgRNA10_rv2	CTGGTCAGCTCTCACCGT	PPARD genomische DNA
SMRT_F1zuF2_fw	CCCAGTCCTCCTCACACAGAC	pMSCVbsd-PPARD-SMRT
SMRT_F2zuF3_fw	CAGATGCGACAACTCGCAGTG	pMSCVbsd-PPARD-SMRT
SMRT_F3zuF4_fw	CTGCTTGAACACGGAAGGAAGT	pMSCVbsd-PPARD-SMRT
SMRT_F3zuF2_rv	GGCTACCGTCTTCCGTTTCGAG	pMSCVbsd-PPARD-SMRT

Tabelle 9: Sequenzierungsprimer

RT-qPCR Primer

genomische Region	forward Sequenz (5'-3')	reverse Sequenz (5'-3')
<i>ABCA1</i>	TTACCAGAGGAGATGCTTTCCTTA	GGCAGTAGCCCATGTTCTGA
<i>ANGPTL4</i>	TTTTGGTGAAC TGCAAGATGA	GAAGTCCACTGAGCCATCGT
<i>PDK4</i>	TTATACATACTCCACTGCACCA	ATAGACTCAGAAGACAAAGCCT
<i>PLIN2</i>	GGAATCTTTAGATGACGTGATGG	CAAGTCTATGGTGGTGAAATCAA
<i>RPL27</i>	AAAGCTGTCATCGTGAAGAAC	GCTGTCAC TTTGCGGGGGTAG
<i>TSC22D3</i>	CTTCTCTTCTCTGCTTGGAGGG	CGATCTTGTTGTCTATGGCCAC

Tabelle 10: RT-qPCR Primer**Primer für *in vitro* RNP-Test**

Primername	Sequenz	Template
NCOR1_gRNA-T_fw3	CTCAGCCACAAC TGGGAGT	genomische DNA
NCOR1_gRNA-T_rv3	CCCCTCTGCACAAATGCTTACC	genomische DNA

Tabelle 11: Primer für *in vitro* RNP-Test**2.4.3 Plasmide****Leervektoren**

pBABEhyg	Clontech
pcDNA3.1	Life Technologies (Invitrogen)
pMSCVbsd	Labor R. Agami ^[289]
pMSCVhyg	Clontech

Expressionsplasmide

pMSCVbsd-PPARD	Labor AG Müller/ Adhikary
pWZLneo-ecoR	Labor S. W. Lowe ^[255]

Neue Klonierungen von Kollegen im Zeitraum dieser Doktorarbeit

pMSCVbsd-PPARD-SMRT208-911as (SSSS)	Franziska Liss (Master-Praktikantin)
-------------------------------------	--------------------------------------

Eigene Klonierungen

Dominant-negatives NCoR1 (dnNCoR1)

pMSCVbsd-dnNCoR1
 pMSCVhyg-dnNCoR1
 pBABEhyg-dnNCoR1
 pcDNA3.1neo-dnNCoR1

PPAR β / δ -NCoR1/SMRT-Fusionskonstrukte

pMSCVbsd-PPARD-NCOR201-891as (NNNN)
 pMSCVbsd-PPARD-NCOR/SMRT-NNSN
 pMSCVbsd-PPARD-NCOR/SMRT-SSNS

Eigene Mutagenesen

pMSCVbsd-PPARD Mutanten

V254A	I420R	T423A-T427D
V254R	K421A	T423D-T427A
T261R	K421R	S428A
T261R-V279R	K422A	H430K
K283A	K422R	L433A
K322A	K421A-K422A	E435A
K322R	K421R-K422R	D439A

Mutanten der PPAR β / δ -NCoR1/SMRT-Fusionskonstrukte

pMSCVbsd-PPARD-H413W-NCOR201-891as
 pMSCVbsd-PPARD-H413W-NCOR/SMRT-NNSN

2.4.4 crRNAs für CRISPR/Cas9

NCOR1

crRNA #1:	GGGTGTTGGGAAATGTATAC	(TGG)
crRNA #2:	AATGTATACTGGACAGAGTG	(AGG)
crRNA #4:	GTATACTGGACAGAGTGAGG	(AGG)

2.5 Organismen

2.5.1 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp/ Ursprung	Herkunft	Medium
Caki-1	klarzelliges Nierenkarzinom (Haut-Metastase)	ATCC, HTB-46	McCoy's 5A
MDA-MB231- <i>luc2</i>	Mamma-Adenokarzinom (Pleuraerguss)	Caliper ^[40]	McCoy's 5A
MDA-MB231- <i>luc2</i> ecoR	MDA-MB231- <i>luc2</i> , stabil trans- fiziert mit dem murinen ecotropen Rezeptor Slc7a1	Adhikary Labor	McCoy's 5A 500 µg/ml G418
MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 PPARβ/δ KO	etabliert durch CRISPR/Cas9 vermittelten <i>Knockout</i> von PPARβ/δ in MDA-MB231- <i>luc2</i>	Adhikary Labor, Masterarbeit N. Legrand ^[155]	McCoy's 5A
MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 PPARβ/δ KO ecoR	MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 PPARβ/δ KO, stabil transfiziert mit dem muri- nen ecotropen Rezeptor Slc7a	Adhikary Labor, Masterarbeit N. Legrand ^[155]	McCoy's 5A 500 µg/ml G418
φNX-eco (Phoenix-eco)	Verpackungszelllinie, abgeleitet von HEK293T (<i>human embryonic kidney</i>)	Nolan Labor ^[139]	DMEM

Tabelle 12: Verwendete Zelllinien

2.5.2 Bakterienstämme

Zur Produktion und Präparation von Plasmiden wurden die klonierten Konstrukte in kompetente *E.coli* Bakterien der folgenden Stämme transformiert:

***E.coli* DH5α ^[36]**

F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ80*dlacZ*Δ*M15* Δ(*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(*r_K*⁻ *m_K*⁺), λ-

***E.coli* XL1-Blue ^[36]**

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [*F*['] *proAB lacI*^qΔ*M15 Tn10* (Tet^R)]

2.6 Software und Datenbanken

Auswertungs- & Planungstools

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • ApE (<i>A plasmid Editor</i>) | M. Wayne Davis |
| • Clustal Omega | Conway Institute UCD Dublin |
| • Clustal X | http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ |
| • gBlocks® Gene Fragments Entry Tool | https://eu.idtdna.com/site/order/gblockentry |
| • GraphPad Prism 6 | GraphPad Software, La Jolla (USA) |
| • Microsoft® Office Mac 2011 | Microsoft, Redmond (USA) |
| • NEBaseChanger | https://nebasechanger.neb.com/ |
| • NEBuffer Performance Chart | New England BioLabs, Ipswich (USA) |
| • NEBcloner | https://nebcloner.neb.com/#!/redigest |
| • Primer-BLAST | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ |
| • PyMOL | DeLano Scientific, San Carlos (USA) |
| • SnapGene® Viewer 4.3.4 | https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/ |
| • UCSC In-Silico PCR | http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr |

Geräte- & Analysesoftware

- | | |
|----------------------------------------|----------------------------------------------|
| • Analysesoftware NanoDrop 2000/ 2000c | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| • ImageLab™ Version 5.0 | BioRad Laboratories, Hercules (USA) |
| • INTAS GDS Software | Intas Science Imaging Instruments, Göttingen |
| • Leica Application Suite LAS V4.7 | Leica, Wetzlar |
| • Mx3005P Analysesoftware | Agilent Technologies, Santa Clara (USA) |

Genom- & Proteindatenbanken

- | | |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • Basic Local Alignment Search Tool | BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| • Ensembl Genome Browser | http://www.ensembl.org/index.html |
| • Entrez Gene Datenbank | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene |
| • Human BLAT Search | http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat |
| • NCBI Databases | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| • RCSB Protein Data Bank | http://www.rcsb.org |
| • UCSC Genome Browser | http://genome.ucsc.edu/ |
| • UniProt (<i>Universal Protein Resource</i>) | http://www.uniprot.org/ |

Publikationsdatenbank

- | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| • PubMed | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|

3 Methoden

Einige der nachfolgend aufgeführten Methoden wurden bereits in der eigenen Masterarbeit ^[155] auf vergleichbare Weise durchgeführt und beschrieben. Daher wurde die Beschreibung einzelner Methoden in überarbeiteter Fassung übernommen.

3.1 Klonierungen

3.1.1 Klonierungsstrategien

Im Folgenden werden die jeweils gewählten Strategien zur Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide zusammenfassend erläutert. Da die einzelnen Klonierungsschritte stets einem vergleichbaren Konzept folgten, werden sie in diesem Kapitel nicht für jede der einzelnen Klonierungsstrategien im Detail besprochen. Eine Beschreibung ihrer Durchführung erfolgt stattdessen separat in späteren Kapiteln (Kapitel 3.1.2 bis Kapitel 3.1.13).

3.1.1.1 PPAR β/δ -NCoR1/SMRT-Fusionskonstrukte

Als Basis für die Klonierung der PPAR β/δ -NCoR1/SMRT-Fusionskonstrukte diente der retrovirale Vektor pMSCVbsd-PPARD, der bereits aus früheren Arbeiten der AG Müller vorlag. Im Anschluss an die Klonierung der reinen PPAR β/δ -NCoR1- und PPAR β/δ -SMRT-Fusionskonstrukte sollte für weiterführende Experimente ein Austausch einzelner Domänen der beiden Co-Repressoren erfolgen. Um dies zu ermöglichen, wurde die Sequenz der Inserts *in silico* geplant (unter Verwendung des *gBlocks® Gene Fragments Entry Tools*) und die Firma *Integrated DNA Technologies* (IDT) mit der Synthese beauftragt. Durch stille Mutationen wurden in den beiden Inserts an jeweils korrespondierenden Positionen die gleichen Restriktionsschnittstellen eingefügt (Abbildung 20, nächste Seite), sodass sie einen Austausch der dazwischenliegenden Sequenzfragmente erlauben.

Um einen Übergang von der *PPARD* cDNA in die zu fusionierende cDNA des NCoR1 bzw. SMRT N-Terminus ohne die Verschiebung des Leserasters zu gewährleisten, wurde am 5' Ende der Inserts ein Teil der *PPARD* cDNA bis zur für die Klonierung genutzten *SbfI*-Restriktionsschnittstelle angefügt. Am 3' Ende wurde wie bereits bei der Klonierung der *PPARD* cDNA die *XhoI* Schnittstelle der *Multiple Cloning Site* genutzt. Die Fusionskonstrukte kodieren für die Aminosäuren 1-428 von PPAR β/δ (d.h. ohne die Helix 12), die C-terminal über einen Linker (3x GGGGS) mit den Aminosäuren 1-891 von NCoR1 bzw. 1-911 von SMRT verbunden sind.

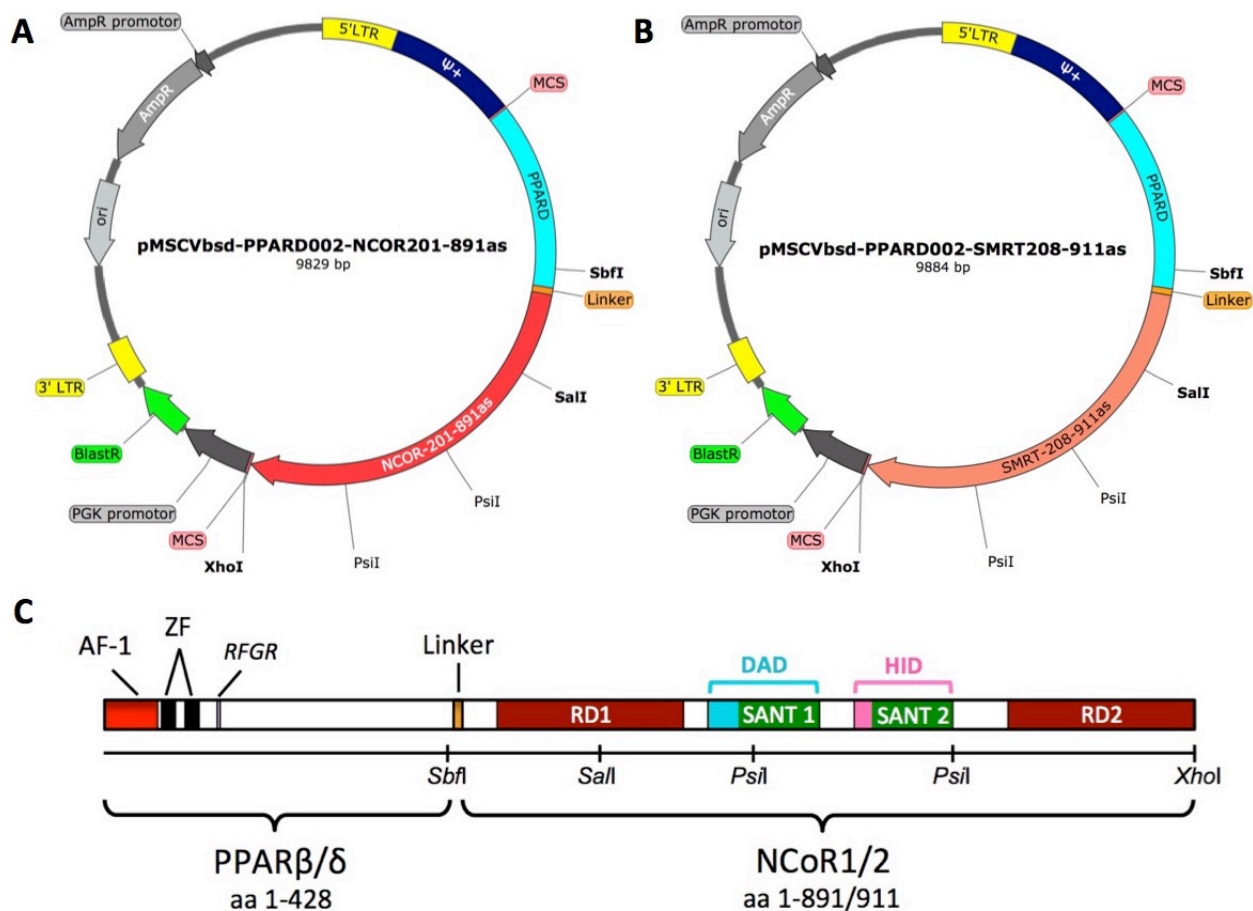


Abbildung 20: Klonierungsstrategie PPARβ/δ-NCOR/SMRT-Fusionskonstrukte in pMSCVbsd. A/B) Vektorkarte des pMSCVbsd-Vektors (*Murine Stem Cell Virus*, retrovirales Expressionssystem, von Voorhoeve und Agami 2003 ^[289]) mit den cDNA-Inserts des PPARβ/δ-NCOR-Fusionskonstruktes (A) bzw. des PPARβ/δ-SMRT-Fusionskonstruktes (B). Die Inserts wurden über die *SbfI* Schnittstelle der *PPARD* cDNA und die *XhoI* Schnittstelle im Vektor eingefügt. C) Schematische Darstellung der PPARβ/δ-NCOR/SMRT-Fusionsproteine bestehend aus den ersten 428 Aminosäuren des Kernrezeptors PPARβ/δ (d.h. ohne Helix 12) sowie den ersten 891 (NCOR1) bzw. 911 (SMRT) Aminosäuren der Co-Repressoren, verbunden über einen 3x GGGGS-Linker. Der N-terminale Abschnitt von NCoR1 bzw. SMRT enthält die Repressionsdomänen RD1 und RD2. Im Bereich des dritten Fragments (*PsiI*-*PsiI*) liegt die Deacetylase-Aktivierungsdomäne (DAD) inklusive der SANT1-Domäne und die Histon-Interaktionsdomäne (HID) mit der SANT2-Domäne.

3.1.1.2 Dominant-negatives NCoR1 (dnNCOR1)

Um unterschiedlich starke Expressionslevel erreichen zu können, wurde das dominant-negative NCoR1 Fragment (Aminosäuren 1-304) in verschiedene Vektoren kloniert. Das Fragment trägt N-terminal einen FLAG-Tag, um die Expression im Western Blot (Kapitel 3.3.1) überprüfen zu können. Ein Kernlokalisierungssignal (*Nuclear Localization Signal*, NLS) gewährleistet die Translokation in den Zellkern. Neben diesen Elementen kodiert das von der Firma *Integrated DNA*

Technologies (IDT) synthetisierte Insert für die Aminosäuren 1-304 des Co-Repressors NCoR1. Diese enthalten die Repressionsdomäne RD1 mit den Interaktionsbereichen für weitere Unter-einheiten der NCoR1/SMRT-Komplexe, GPS2 und TBL1.

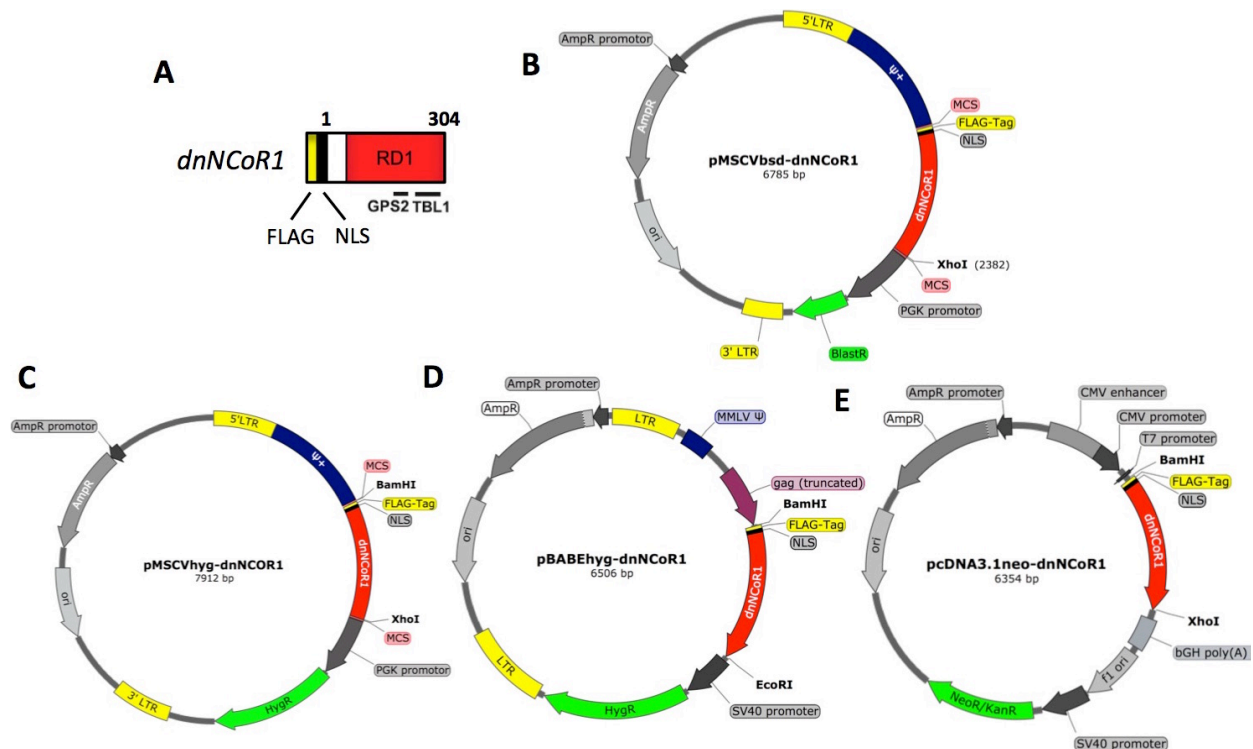


Abbildung 21: Klonierungsstrategie dnNCoR1 in vier Vektoren. A) Schema dnNCoR1. Das dominant-negative NCoR1 (dnNCoR1) Fragment trägt zur Detektion im Western Blot einen N-terminalen FLAG-Tag und für die Einschleusung in den Zellkern ein Kernlokalisationssignal (NLS). Es kodiert für die Aminosäuren 1-304 von NCoR1 und somit für die Repressionsdomäne RD1 inklusive der Bindungsbereiche für GPS2 und TBL1. B-E) Vektorkarten der klonierten Vektoren pMSCVbsd-dnNCoR1 (B), pMSCVhyg-dnNCoR1 (C), pBABEhyg-dnNCoR1 (D) und pcDNA3.1neo-dnNCoR1 (E).

Die Klonierung in die retroviralen Vektoren pMSCVbsd und pMSCVhyg erfolgte 5' über die Sites *Bam*HI (Insert) bzw. *Bgl*II (Vektor), die kompatible Überhänge generieren, und 3' über die *Xho*I-Schnittstelle. Nach der erfolgreichen Klonierung der pMSCV-dnNCoR1-Konstrukte konnten diese als PCR-Template zur Amplifikation des Inserts für die darauffolgenden Klonierungen verwendet werden. Während für den Vektor pcDNA3.1neo die Schnittstellen *Bam*HI und *Xho*I beibehalten werden konnten, wurde für den Vektor pBABEhyg durch den Revers-Primer eine *Eco*RI Schnittstelle statt der *Xho*I Site eingefügt.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch eine photometrische Messung am NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Das Messprinzip basiert auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm zu absorbieren. Aus dem mittleren Extinktionskoeffizienten von $50 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für doppelsträngige DNA (dsDNA) bzw. $40 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für einzelsträngige RNA (ssRNA) ^[73] ergeben sich die folgenden Formeln, anhand derer die Konzentration von der NanoDrop Software berechnet wird:

$$\text{Konzentration dsDNA [ng/ }\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times 50$$

$$\text{Konzentration ssRNA [ng/ }\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times 40$$

Im Gegensatz zu Nukleinsäuren haben Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Daher kann der Quotient der Absorptionen $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ als Maß für die Reinheit der Nukleinsäureprobe im Hinblick auf entsprechende Kontaminationen herangezogen werden. Ein Wert von 1,8 gilt bei DNA-Lösungen als rein, während ein Wert von 2,0 bei RNA-Lösungen als rein angesehen wird.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) lassen sich spezifische DNA-Sequenzen amplifizieren, um beispielsweise Insert-Sequenzen für Klonierungen zu gewinnen (Kapitel 3.1.1). Nach einer initialen Denaturierung der Template-DNA (und gegebenenfalls der Aktivierung der Polymerase) bei über 95 °C folgen 25 bis 40 Zyklen eines dreistufigen Temperaturprofils, in dessen Verlauf eine thermostabile DNA-Polymerase das gewünschte DNA-Segment vervielfältigt. Am Beginn jedes Zyklus wird die DNA erneut bei über 95 °C denaturiert. Während der darauffolgenden Abkühlung auf die Hybridisierungstemperatur (in der Regel im Bereich des Schmelzpunktes der Primersequenzen) können sich die Oligonukleotide (Primer) spezifisch an die komplementäre Sequenz in der nun einzelsträngig vorliegenden Template-DNA anlagern. Anschließend wird die Temperatur auf 72 °C, das Temperaturoptimum der Polymerase, angehoben. Ausgehend von den angelagerten Primern kann nun die Polymerase die Elongation in 5' zu 3' Richtung beginnen und den fehlenden Strang synthetisieren, sodass wieder ein DNA-Doppelstrang entsteht. Das amplifizierte Segment wird dabei durch den *forward*-Primer am einen Strang und den *reverse*-Primer am komplementären Strang begrenzt. Während des Denaturierungsschrittes im nächsten Zyklus dissoziiert jeder neue Doppelstrang in zwei Einzelstränge, sodass nun im Vergleich zum vorangehenden Zyklus doppelt so viele Template-Moleküle vorliegen. Dadurch ergibt sich eine exponentielle Zunahme des zu amplifizierenden DNA-Segments.

In dieser Arbeit wurde für konventionelle PCRs in der Regel die *Q5[®] High-Fidelity DNA-Polymerase* der Firma *New England Biolabs* (NEB) verwendet. Diese ist thermostabil und besitzt eine 3' zu 5' Exonuklease-Aktivität. Durch die Fusion mit einer Sso7d Domäne soll die Prozessivität verstärkt und eine robuste DNA-Amplifikation unterstützt werden ^[205]. Die Komponenten für einen 25 µl Ansatz wurden wie in Tabelle 13 angegeben vereinigt. Für die Reaktion wurde das in Tabelle 14 dargestellte Temperaturprogramm verwendet.

Komponente	Volumen
5x Reaktionspuffer	5 µl
Primer (<i>forward</i> und <i>reverse</i>) je 10 µM	je 1,25 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
DNA Template (z.B. Plasmid 10 ng/ µl)	1,5 µl
<i>Q5[®] High-Fidelity DNA-Polymerase</i>	0,25 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 13: *Q5[®]-PCR Reaktionsansatz*

Vorgang	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
Primer-Annealing	55-68 °C	30 s
Elongation	72 °C	20-30 s/ kb
Finale Elongation	72 °C	2-10 min

} 30x

Tabelle 14: *Temperaturprogramm der Q5[®]-PCR, Pqstar 96x Universal Gradient*

3.1.4 PCR-Mutagenese (*Site-directed Mutagenesis*)

Zur Generierung von *PPARD*-Mutanten wurde eine zielgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) des retroviralen Vektors *pMSCVbsd-PPARD* unter Verwendung des *Q5[®] Site-Directed Mutagenesis* Kit der Firma *New England Biolabs* (NEB) durchgeführt. Das Primer-Design wurde durch das *NEBaseChanger Tool* unterstützt. Für einen Großteil der Mutagenesen wurden die Vorschläge des Tools übernommen. Bei sterisch anspruchsvollen Mutagenesen oder dem Scheitern des ersten Primerpaares wurden die Primer jedoch nach eigenen Überlegungen mit Hilfe der Software *ApE* geplant. Das nicht-überlappende, *back-to-back* Primerdesign ermöglicht neben dem zielgerichteten Einfügen von Mutationen auch beliebig große Deletionen.

Mutagenese-PCR

Das Q5[®] *Site-Directed Mutagenesis* Kit enthält einen Reaktionsmix, der abgesehen von den Primern und dem Template, bereits alle für die PCR erforderlichen Komponenten enthält. Wie der Name des Kits andeutet, enthält der Mix die bereits in Kapitel 3.1.3 beschriebene Q5[®] *High-Fidelity DNA-Polymerase*. Sie gewährleistet durch ihre 3' zu 5' Exonuklease-Aktivität eine sehr geringe Fehlerrate, was bei dieser Größe des PCR-Produktes von großer Bedeutung ist. Aufgrund der Wahl von nicht-überlappenden Primern entsteht in der PCR zunächst ein lineares Produkt. Die Zusammensetzung einer Q5[®]-Mutagenese Reaktion kann Tabelle 15 entnommen werden. Das Temperaturprogramm ähnelt dem der konventionellen PCR und ist in Tabelle 16 dargestellt.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Q5 [®] Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	12,5 µl	1x
forward Primer 10 µM	1,25 µl	0,5 µM
reverse Primer 10 µM	1,25 µl	0,5 µM
Template DNA (z.B. Plasmid 10 ng/ µl)	1,5 µl	15 ng (in 25 µl)
H ₂ O	8,5 µl	

Tabelle 15: Reaktionsansatz Q5[®] Site-directed Mutagenesis PCR

Vorgang	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	98 °C	30s	
Denaturierung	98 °C	10 s	} 25x
Primer-Annealing	55-68 °C	30 s	
Elongation	72 °C	4 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Tabelle 16: Temperaturprogramm Q5[®] Site-directed Mutagenesis PCR, Pqstar 96x Univ. Grad.

Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung des PCR-Produktes

Aufgrund der Beobachtung, dass bei der Q5[®]-Mutagenese PCR kleinere Nebenprodukte entstanden, erfolgte abweichend vom Protokoll des Herstellers eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel (Kapitel 3.1.7). Das gewünschte Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben aufgereinigt. Die Ausbeute bei einem Elutionsvolumen von 20 µl lag bei 4-25 ng/µl.

KLD-Reaktion (Kinase, Ligase, DpnI)

Um Verluste durch die Gelaufreinigung auszugleichen, wurden für die nachfolgende KLD-Reaktion 4 µl des aufgereinigten PCR-Produktes eingesetzt (abweichend von 1 µl der PCR-Reaktion

laut Herstellerprotokoll). Der verwendete Enzym-Mix enthält drei Enzyme: eine Kinase, eine Ligase und das Restriktionsenzym *DpnI*. Die Kinase phosphoryliert die 5' Enden des PCR-Produktes. Dies ist erforderlich, damit die Ligation der Enden des linear vorliegenden PCR-Produktes erfolgen kann, sodass ein zirkuläres Plasmid entsteht. Das Restriktionsenzym *DpnI* ist methylierungssensitiv und schneidet selektiv ausschließlich die DNA des Template-Plasmids, das aus Bakterien isoliert wurde und daher Methylierungen trägt. Das in der PCR amplifizierte, mutierte PCR-Produkt dient hingegen nicht als Substrat, da es frei von Methylierungen ist. Die Komponenten der KLD-Reaktion können Tabelle 17 entnommen werden.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
aufgereinigtes PCR-Produkt	4 µl	16-125 ng in 10 µl
2x KLD Reaktionspuffer	5 µl	1x
10x KLD Enzym-Mix	1 µl	1x

Tabelle 17: Zusammensetzung KLD Reaktionsansatz

Durch die Erhöhung des Anteils von aufgereinigtem PCR-Produkt in der KLD-Reaktion von 1/10 auf 4/10 könnte eine größere Menge inhibierender Kontaminationen in die Reaktion eingebracht worden sein. Daher wurde die vom Hersteller empfohlene Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur auf bis zu 30 min bei Raumtemperatur und 30 min bei 37 °C ausgedehnt, um dem Ablauf der drei Reaktionsschritte mehr Zeit zu geben.

Transformation, Plasmidpräparation und Sequenzierung

Nach Ablauf der KLD-Reaktion wurden die zirkularisierten PCR-Produkte zur Plasmid-Amplifikation durch Transformation in Bakterien eingebracht (Kapitel 3.1.10). Aus den gewachsenen Klonen wurden Flüssigkulturen angeimpft, um eine Plasmidpräparation (Kapitel 3.1.12) durchführen zu können. Mittels Sequenzierung (Kapitel 3.1.13) wurde überprüft, ob die gewünschte Mutation erfolgreich eingefügt werden konnte.

3.1.5 Restriktionsverdau

Die Endonuklease-Aktivität von Restriktionsenzymen kann dazu genutzt werden, DNA sequenzspezifisch durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen zu spalten. Restriktionsenzyme vom Typ II schneiden die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer Erkennungssequenz. Die Position der Schnitte ist ebenfalls charakteristisch für das jeweilige Enzym. Werden die beiden DNA-Stränge an der gleichen Position geschnitten, ergeben sich sogenannte stumpfe Enden (engl. *blunt ends*). Für Klonierungen werden in der Regel Enzyme mit einem punktsymmetrisch

versetzten Schnittmuster bevorzugt, da hierbei sogenannte „klebrige“ Enden (engl. *sticky ends*) entstehen, die eine Hybridisierung kompatibler Überhänge ermöglichen und die Ligation von Vektor und Insert erleichtern.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma *New England Biolabs* (NEB) bezogen und mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern verwendet. Bei Restriktionsverdau, für die zwei Enzyme parallel eingesetzt wurden, erfolgte die Wahl des Puffers mit Hilfe der *Double Digest Finder* Funktion des Tools *NEBcloner*. Ein Restriktionsansatz setzte sich wie in Tabelle 18 angegeben zusammen.

Komponente	Volumen/ Menge
10x Enzympuffer	2,5 µl
Plasmid-DNA bzw. Insert	250 ng – 3 µg
Restriktionsenzym 1	1 µl
Restriktionsenzym 2	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 18: *Reaktionsansatz eines Restriktionsverdau*

Die Restriktionsansätze wurden für 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Während die Insert-DNA anschließend wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben aufgereinigt werden konnte, wurde die geschnittene Plasmid-DNA zunächst dephosphoryliert (Kapitel 3.1.6) und in einer Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.1.7) aufgetrennt.

3.1.6 Desphosphorylierung von geschnittenen Plasmiden

Um bei Klonierungen den Hintergrund durch Leervektor-Religationen aufgrund von unvollständig geschnittenem Vektor zu reduzieren, wurde eine Dephosphorylierung der geschnittenen Plasmide durchgeführt. Das verwendete Enzym antarktische Phosphatase wurde von der Firma NEB bezogen und ist in allen NEB-Puffern aktiv, sofern der Reaktionsansatz mit dem vom Hersteller empfohlenen *Antarctic Phosphatase Reaction Buffer* ergänzt wird (Quelle: NEB). Dieser enthält die für die enzymatische Aktivität als Co-Faktoren erforderlichen zweiwertigen Zink-Kationen.

Dem 25 µl Restriktionsansatz wurden daher 1,5 µl 10x *Antarctic Phosphatase Reaction Buffer* sowie 1,5 µl antarktische Phosphatase zugegeben und das Volumen wurde mit Wasser auf 40 µl aufgefüllt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Phosphatase bei 80 °C für zwei Minuten inaktiviert. Die geschnittene und dephosphorylierte Plasmid-DNA wurde anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 3.1.7) und das Fragment mit der gewünschten Größe wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben aufgereinigt.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats wandert DNA im elektrischen Feld zur Anode. Je größer das DNA-Fragment ist, desto stärker wird seine Wanderung im Agarose-Gel durch die Gelmatrix behindert, sodass große Fragmente in der gleichen Zeit eine kürzere Laufstrecke zurücklegen als kleine Fragmente. Durch die Variation des Agarose-Anteils im Gel kann seine Struktur auf die Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente optimiert werden.

Für die Auftrennung von Plasmid-DNA mit einer Größe zwischen fünf und zehn Kilobasenpaaren wurden niederprozentige Gele (0,5-1 %) verwendet, während für kleinere Fragmente (100-3000 Basenpaare) höherprozentige Gele (1-2 %) eingesetzt wurden. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Laufkammer unter Verwendung von 1x TAE-Puffer als Laufpuffer. Nach dem Aufkochen der Agarose in 1x TAE-Puffer, wurde die Gellösung im Verhältnis 1:25.000 mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Midori Green* versetzt und in den Gelschlitten gegossen. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden als Größenstandards die Marker *GeneRuler 1kb DNA Ladder* oder *GeneRuler Low Range DNA Ladder* verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1: 10 mit 6x *Orange Loading Dye* versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung durchgeführt. Das im Gel enthaltene *Midori Green* lagert sich sequenzunabhängig an DNA an und kann durch UV-Licht angeregt werden. Für die Detektion der DNA-Fragmente wurde die *Gel iX Imager* Geldokumentation der Firma *Intas Science Instruments* genutzt. Die in weiteren Klonierungsschritten benötigten DNA-Fragmente wurden am UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben isoliert.

3.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten sowie von Plasmid-DNA nach Restriktionsverdau oder Mutagenese-PCR kam das *QIAquick PCR Purification* Kit der Firma *QIAGEN* zum Einsatz. Sofern keine Auftrennung der DNA-Fragmente durch eine Agarose-Gelelektrophorese erfolgte, wurde die aufzureinigende Probe mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und anschließend nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

Ausgeschnittene Agarosegel-Banden wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zu einem Gesamtvolumen von ca. 750 µl mit NTI-Puffer aus dem Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* von Macherey-Nagel überschichtet. Nach dem Erwärmen der Fragmente bei 55 °C im Heizblock, wurde die Lösung direkt auf die *QIAquick*-Säulen des Kits *QIAquick PCR Purification* Kits (*QIAGEN*) aufgetragen. Bis auf das Auslassen des ersten Schritts (Zugabe des Bindungs-

puffers zum PCR-Produkt) erfolgte die Aufreinigung der DNA aus Gelbanden ab hier äquivalent zur Aufreinigung von PCR-Produkten.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente unter Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen nebeneinander liegenden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Kettenenden wird als Ligation bezeichnet. Aufgrund der Erforderlichkeit einer freien Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA-Fragmente kann ein linearisierter, an beiden Enden dephosphorylierter Vektor nicht mit sich selbst religieren (siehe Kapitel 3.1.6). Das in vorherigen Klonierungsschritten mit Restriktionsenzymen geschnittene Insert besitzt hingegen freie 5'-Phosphatenden und kann daher mit dem Plasmid an den kompatiblen Überhängen ligieren. Um die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Integration des Inserts zu erhöhen, wurde das Insert mit einem achtfachen äquimolaren Überschuss in die Ligationsreaktion eingesetzt. Die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes ist in Tabelle 19 dargestellt.

Komponente	eingesetzte Menge
10x T4 DNA Ligase Puffer (enthält ATP)	2 µl
geschnittener, dephosphorylierter Vektor	100 ng
geschnittenes Insert	8x äquimolarer Überschuss
T4 DNA Ligase	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 19: Reaktionsansatz für eine Ligationsreaktion

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit von nacheinander bis zu 30 Minuten bei Raumtemperatur und 37 °C konnte der Ligationsansatz direkt für die Transformation in Bakterien (Kapitel 3.1.10) verwendet werden.

3.1.10 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde diese in kompetente *E. coli* Bakterien der Stämme XL1-Blue oder DH5α eingebracht, welche ihre Fähigkeit zur Aufnahme freier DNA durch eine Calciumchlorid-Behandlung (durchgeführt von M. Alt) erlangt haben. Alle Arbeiten mit geöffnetem Deckel der jeweiligen Gefäße wurden zur Vermeidung von Kontaminationen neben dem Bunsenbrenner durchgeführt.

Inkubation der Bakterien mit der zu transformierenden DNA

Zunächst wurden 90-150 µl der auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt. Bei Ligationen (Kapitel 3.1.9) wurde die Hälfte des Ligationsansatzes (10 µl) eingesetzt, der 100 ng Plasmid-DNA und die achtfache molare Menge des jeweiligen Inserts enthielt. Nach einer zielgerichteten Mutagenese-PCR (Kapitel 3.1.4) wurde die Hälfte des KLD-Reaktionsansatzes für die Transformation verwendet. Dieser enthielt abhängig von der Ausbeute des aus dem Agarose-Gel aufgereinigten PCR-Produktes zwischen 20 und 100 ng DNA. Für Re-Transformationen bereits klonierter Plasmide wurden 50 ng Plasmid-DNA verwendet. Um die Aufnahme der DNA durch die Bakterien nicht zu stören, wurde stets darauf geachtet, dass das Volumen der DNA-Lösung unter 10 % des gesamten Transformationsansatzes lag.

Hitzeschock und Inkubation bei 37 °C

Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden, während dem die DNA von den kompetenten Bakterien aufgenommen wurde. Die Bakterien wurden kurz auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 800 µl antibiotikafreiem LB-Medium für 30 Minuten bei 37 °C und 130 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert. Diese Zeitspanne entspricht etwas mehr als einer Generationszeit und dient der Erholung der *E. coli* Bakterien vom Transformationsstress sowie der Expression des auf dem transformierten Plasmid kodierten Ampicillin-Resistenzgens.

Ausplattieren auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten

Da Re-Transformationen eine deutlich höhere Effizienz aufweisen als Transformationen von zum Beispiel Ligationsansätzen wurden hier nur 50 µl der Bakteriensuspension auf eine ampicillinhaltige LB-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) gegeben. Für Transformationsansätze aus Ligationen und Mutagenesen wurde die Bakteriensuspension zwei Minuten bei 300 x g abzentrifugiert, der Überstand bis auf 200 µl abgenommen und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Nach Überführung auf eine ampicillinhaltige LB-Agarplatte wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe eines in Ethanol getränkten und abgeflamten Drigalski-Spatels gleichmäßig auf der Platte verteilt. Über Nacht erfolgte eine Inkubation der Platten bei 37 °C. Hierbei besitzen die Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, aufgrund der Ampicillinresistenz einen Selektionsvorteil.

3.1.11 Kolonie-PCR

Im Vorfeld der Plasmidpräparation wurde eine Kolonie-PCR mit den Sequenzierungsprimern des jeweiligen Vektors durchgeführt, um die Klone auf das Vorhandensein eines Inserts im aufgenommenen Plasmid zu screenen. Erst bei einem positiven Ergebnis dieses Vorab-Screenings wurde die Präparation durchgeführt.

Zunächst wurden von der ampicillinhaltigen LB-Agarplatte (Kapitel 3.1.10) einzelne Kolonien gepickt, um kleine Flüssigkulturen in 300 µl LB-Medium mit Ampicillin anzupflanzen. Diese wurden für drei Stunden im Inkubationsschüttler bei 37 °C inkubiert. In die darauffolgende PCR-Reaktion wurde 1 µl der Flüssigkultur eingesetzt. Um das Vorab-Screening der Klone mittels Kolonie-PCR möglichst zeitsparend und effizient zu gestalten, wurde der Reaktionsmix ImmoMix™ Red (2x) der Firma Bioline verwendet. Dieser enthält, abgesehen von Template und Primern, bereits alle für die PCR benötigten Komponenten. Die Taq-Polymerase gewährleistet schnelle Amplifikationszeiten und der im Mix enthaltene rote Farbstoff sowie eine ausreichend hohe Dichte des Mixes ermöglichen ein direktes Laden der Proben auf ein Agarose-Gel ohne die Zugabe eines zusätzlichen Ladepuffers ^[28]. In eine 20 µl Reaktion wurden 10 µl ImmoMix™ Red (2x), je 4 pmol des *forward*- bzw. *reverse*-Primers und 1 µl der Flüssigkultur eingesetzt. Das Temperaturprogramm der PCR kann Tabelle 20 entnommen werden.

Vorgang	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung, <i>Hot Start</i>	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	20 s
Primer-Annealing	58-62 °C	20 s
Elongation	72 °C	15-30 s/ kb
Finale Elongation	72 °C	5 min

} 35x

Tabelle 20: Temperaturprogramm der Kolonie-PCR, ImmoMix™ Red, Pqstar 96x Univ. Grad.

3.1.12 Plasmidpräparationen

3.1.12.1 Mini-Präparationen

Zur Untersuchung von Plasmiden auf die Integration des jeweiligen Inserts in den Vektor sowie auf die Korrektheit der Insertsequenz bzw. das erfolgreiche Einfügen der gewünschten Mutation, wurden geringe Mengen Plasmid-DNA benötigt.

Animpfen von Flüssigkulturen

Hierzu wurde von den ampicillinhaltigen LB-Agarplatten der vorangegangenen Transformation (Kapitel 3.1.10) je ein einzelner Klon gepickt und in einem Kulturröhrchen in 5 ml LB-Medium (mit 100 µg/ ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C und 130 rpm im Inkubationsschüttler kultiviert. Sofern zuvor eine kleine Flüssigkultur vorlag, die in einer Kolonie-PCR positiv getestet wurde, erfolgte das Animpfen direkt aus dieser Kultur. Am Folgetag wurden vor Beginn der Plasmidpräparation je 2 µl der Flüssigkultur auf eine LB-Agar/ Ampicillin-Platte pipettiert um die Klone für spätere Kulturen zu sichern. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde die so erhaltene Masterplatte bei 4 °C gelagert.

Plasmidpräparation

Die Mini-Kulturen wurden bei 2000 x g für zehn Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen (Inaktivierung durch Gigasept). Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden Puffer des Kits *NucleoBond® Xtra Midi* der Firma *Macherey-Nagel* ^[170] verwendet. Die Bakterienpellets wurden in 400 µl kaltem RES-Puffer resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Der Resuspensionspuffer (RES-Puffer) enthält RNasen, sodass die im Lysat enthaltene RNA geschnitten wird und bei der späteren DNA-Isolierung nicht zu Verunreinigungen führen kann. Durch die Zugabe von 400 µl des Natriumhydroxid und SDS enthaltenden Lysepuffers (LYS) und vorsichtiges Invertieren der Reaktionsgefäße wurden die Bakterien lysiert. Unter diesen alkalischen Bedingungen kommt es zur Denaturierung von Proteinen sowie der bakteriellen chromosomalen DNA und der Plasmid-DNA. Bei der anschließenden Neutralisierung des Lysats mit 400 µl NEU-Puffer (Neutralisationspuffer) führt das im Puffer enthaltene Kaliumacetat zur Präzipitation des SDS und zum Ausfallen von Proteinen, chromosomaler DNA und Zelltrümmern, während die Plasmid-DNA wieder ihre native Struktur (*supercoiled*) einnimmt und in Lösung verbleibt ^[170]. Die Reaktionsgefäße wurden mehrmals vorsichtig invertiert bis ein flockiges weißes Präzipitat zu erkennen war und die Probe von der Blaufärbung (durch das im Puffer LYS enthaltene *LyseControl*) vollständig in einen farblosen Zustand überging. Zur Abtrennung der flockigen Präzipitats erfolgte eine Zentrifugation bei 17.000 x g für 10 Minuten. Bei der anschließenden Überführung der Überstände in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße war darauf zu achten, diese möglichst ohne Verschleppung ausgefallener Proteine und denaturierter genomischer DNA zu pipettieren. Um eine bessere Trennung zu erreichen, wurde dieser Schritt wiederholt. Allerdings wurde nach dem zweiten Zentrifugationsschritt nur 1 ml der Überstände abgenommen und in frische 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Durch die Zugabe von 700 µl Isopropanol und gründliches Durchmischen wurde die Plasmid-DNA schließlich gefällt und bei 17.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das entstandene Pellet bei einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen um Salze zu entfernen. Nach Abnahme des Überstandes und Trocknung des Pellets wurde die DNA in 30 µl Wasser aufgenommen.

3.1.12.2 Midi-Präparationen

Um die klonierten Konstrukte in Zelllinien einbringen zu können, waren relativ große Mengen an Plasmid-DNA und ein höherer Reinheitsgrad erforderlich. Ausgangspunkt war wie bei der Mini-Präparation eine Übernachtskultur, die allerdings in größerem Volumen (100 ml LB-Medium versetzt mit 100 µg/ ml Ampicillin) in sterilen Glaskolben angesetzt wurde. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des Kits *NucleoBond® Xtra Midi* der Firma *Macherey-Nagel* gemäß Herstellerangaben ^[170]. Das Prinzip der Aufreinigung entsprach hierbei dem Vorgehen bei der Mini-Präparation. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen wurde allerdings zusätzlich eine säulenchromatographische Aufreinigung durch die *XtraMidi* Säulen (silica-basiertes Anionen-austausch-Prinzip) des Kits vor der Isopropanol-Fällung zwischengeschaltet. Das DNA-Pellet wurde je nach Ausbeute in 100-800 µl Wasser aufgenommen, sodass sich bei der Messung am *NanoDrop* eine Konzentration von ca. 1 µg/ µl ergab.

3.1.13 Sequenzierung von Plasmiden

Um die bei der Plasmidpräparation (Kapitel 3.1.12) gewonnenen Plasmide auf das erfolgreiche Einfügen der gewünschten Mutation nach einer PCR-Mutagenese bzw. auf die Korrektheit der Insert-Sequenz nach einer Klonierung zu überprüfen, erfolgte stets eine Sequenzierung. Hierzu wurde der Service der Firma *LGC Genomics* in Anspruch genommen, die Sequenzierungen nach der Sanger-Methode durchführt. Die verwendeten Sequenzierprimer wurden in der Regel vorab aus eigenen Labor-Stocks in die Proben gegeben und sind in Kapitel 2.4.2 aufgelistet. In einem Gesamtansatz von 14 µl wurden 1-2 µg DNA aus einer Midi-Plasmidpräparation bzw. 2-6 µl einer Mini-Plasmidpräparation und 20 pmol des Sequenzierprimers eingesendet. Der Abgleich der sequenzierten Plasmidbereiche mit der gewünschten Sequenz erfolgte durch ein mit Hilfe der Software *ClustalX 2.1* erstelltes Alignment.

3.2 Biochemische und molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde das Kit *NucleoSpin RNA II* ^[169] der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Nach einem Waschschrift in PBS (*Phosphate Buffered Saline*) wurden die auf 6-well Platten befindlichen Zellen mit 350 µl RA1-Lysispuffer (mit 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) pro well lysiert. Die hohe Konzentration chaotroper Salze im Lysepuffer bewirkt eine sofortige Inaktivierung von RNasen und schafft außerdem die nötigen Bedingungen zur Bindung der RNA an die Silica-Matrix. Nach der Lyse der Zellen konnte direkt mit der säulenchromatographischen Aufreinigung der RNA begonnen werden oder die Platten wurden einige Tage bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben, jedoch wurden die Schritte „Aussalzen der Silica-Membran“ und „DNase-Verdau“ ausgelassen. Die gebundene RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und konnte nach einer photometrischen Messung der Konzentration in eine Reverse Transkriptase Reaktion (Kapitel 3.2.2) eingesetzt werden. Sowohl die RNA (kurzfristig) als auch die cDNA wurden bei -20°C gelagert.

3.2.2 Reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR)

Mit der Reverse Transkriptase quantitativen PCR lassen sich die Expressionslevel von Genen auf Transkriptebege gezielt bestimmen. Im Vorfeld muss die RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert (Kapitel 3.2.1) und revers transkribiert werden, um die cDNA (*complementary DNA*) zu erhalten. Erst diese kann in der quantitativen PCR-Messung eingesetzt werden.

Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der RNA wurde das *iScript™ cDNA Synthesis Kit* von *Bio-Rad Laboratories* verwendet. Der mitgelieferte 5x Reaktionsmix enthält, bis auf das separat bereitgestellte Enzym, alle für die Reaktion erforderlichen Bestandteile wie z. B. dNTPs und Primer. Das *iScript™ cDNA Synthesis Kit* nutzt für die Primerproblematik eine Kombination aus Oligo-dT-Nukleotiden und *random* Hexamer-Oligonukleotiden ^[30]. Die Oligo-dT-Primer hybridisieren spezifisch an den komplementären Poly-A-Schwanz am 3'-Ende eukaryontischer mRNA. Hieraus resultiert allerdings eine Begünstigung kurzer mRNAs gegenüber längerer mRNAs bei der Umschreibung in cDNA. Die *random* Hexamer-Oligonukleotide binden zwar zufällig innerhalb des mRNA-Strangs, sie hybridisieren allerdings nicht spezifisch nur an mRNA, sondern auch an andere RNA-Moleküle.

Für die Reverse Transkription kamen für jede Probe gleiche Mengen RNA (500 ng) zum Einsatz. Hierzu wurden im Vorfeld die RNA-Konzentrationen der Proben am *NanoDrop2000* photometrisch bestimmt. Die Ansätze wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und für die RT-Reaktion in einem Thermocycler inkubiert. Nach Ablauf der Synthese wurde die cDNA mit Wasser 1: 10 verdünnt und konnte nun für eine quantitative PCR verwendet werden.

Pipettierschema

5x <i>iScript</i> [™] Reaction Mix	4 µl
<i>iScript</i> [™] Reverse Transcriptase	1 µl
500 ng RNA	x µl
RNase-freies Wasser	ad 20 µl

Inkubationszeiten

Primer-Anlagerung	25 °C	5 min
Reverse Transkription	46 °C	20 min
Inaktivierung Transkriptase	95 °C	1 min

Quantitative PCR (qPCR)

Der Ablauf einer quantitativen PCR entspricht in weiten Teilen einer herkömmlichen PCR. Allerdings wird bei dieser Methode nach jedem Amplifikationszyklus die in den Ansätzen vorliegende DNA-Menge über Laser-induzierte Fluoreszenzsignale gemessen, wodurch eine Echtzeitanalyse ermöglicht wird (PCR-Programm in Tabelle 21). Das Messprinzip basiert auf der Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green* unspezifisch in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Die entstehenden DNA-*SYBR-Green*-Komplexe absorbieren blaues Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittieren grünes Licht bei 521 nm. Da sich die Fluoreszenzzunahme bei optimalen Reaktionsbedingungen (exponentielle Phase) proportional zur Menge an neusynthetisierter DNA verhält, lassen sich aus den gewonnenen Messwerten Rückschlüsse auf die eingesetzte cDNA- und somit auch mRNA-Menge der amplifizierten Nukleinsäure ziehen.

Vorgang	Temperatur	Dauer	
Aktivierung der Thermo-Start DNA-Polymerase	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	} 40x
Primer-Annealing	60 °C	20 s	
Elongation	72 °C	15 s	

Tabelle 21: Temperaturprogramm der RT-qPCR, Thermo Cycler Mx3005P

Um verlässlichere Ergebnisse zu erhalten, wurden für jede Probe Triplikate angesetzt. Zur Normalisierung der Werte für das jeweils untersuchte Transkript diente das Haushaltsgen *RPL27*, dessen Expressionslevel durch PPAR-Liganden und andere Substanzen unbeeinflusst ist, als Referenz. Das verwendete Kit *2x ABsolute[™] qPCR SYBR Green Mix* von *Thermo Scientific* enthielt neben *SYBR Green I Dye* und der *Thermo-Start* DNA-Polymerase alle weiteren für die Reaktion erforderlichen Bestandteile, sodass lediglich die Primer und das Template zu den Ansätzen gegeben werden mussten ^[275] (siehe Tabelle 22). Die Auswertung der Daten erfolgte nach der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode.

Komponente	Volumen
2x <i>ABsolute™ qPCR SYBR Green</i>	5 µl
Primermix (<i>forward</i> und <i>reverse</i>) 20 µM	0,25 µl
cDNA Template (1:10 verdünnt)	4,75 µl

Tabelle 22: RT-qPCR-Reaktionsansatz pro well einer 96-well Platte

Schmelzkurven-Messung

Nach Ablauf der Amplifikationszyklen werden die Ansätze unter ständigem Messen der Fluoreszenz in kleinen Temperaturschritten von 72 °C auf 95 °C erhitzt. Je nach Länge und Basenzusammensetzung des PCR-Produktes liegt der Peak der sich ergebenden Dissoziationskurve und damit der Schmelzpunkt des betrachteten DNA-Strangs bei einer charakteristischen Temperatur. Unspezifische Nebenprodukte sowie Primer-Dimere können daher durch zusätzliche Peaks in dieser Dissoziationskurve erkannt werden. Die eingesetzten Primer sind so gestaltet, dass ihr Produkt eine Exongrenze des entsprechenden Transkripts überspannt. Somit ist gewährleistet, dass nur cDNA amplifiziert wird, die aus prozessierter mRNA umgeschrieben wurde und daher keine Introns enthält. Für genomische DNA hingegen ist der Abstand der Primer durch das dazwischenliegende Intron zu groß als dass eine Amplifikation stattfinden könnte. Aus diesem Grund konnte bei der Isolation der RNA aus Zellen auf den DNase-Verdau verzichtet werden. Die Spezifität der Primer wurde jeweils durch Mitarbeiter der AG Müller/Adhikary mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung des einzigen PCR-Produkts überprüft.

3.2.3 Messung der Proteinkonzentration

Um bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4) gleiche Mengen Protein auftragen zu können, erfolgte eine kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration in den mit Lysepuffer II (RIPA Puffer, siehe ChIP, Kapitel 2.3.2) geernteten Extrakten. Hierbei kam das *DC™ Protein Assay Kit* der Firma *Bio-Rad Laboratories* zum Einsatz. Im Verlauf des Assays kommt es im ersten Schritt zu einer Reaktion zwischen den Peptidbindungen der Proteine im Extrakt und den Kupfer(II)-Ionen der zugegebenen alkalischen Kupfertartrat-Lösung. In einer zweiten Reaktion wird ein hinzugegebenes Folin-Reagenz reduziert, während die aromatischen Reste der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin oxidiert werden. In geringerem Maße sind auch die Aminosäuren Cystein und Histidin an der Reaktion beteiligt. Das Gemisch der unterschiedlichen reduzierten Spezies des Folin-Reagenz weist eine blaue Farbe auf, deren Absorptionsmaximum bei 750 nm liegt ^[29]. Durch die Messung in einem Spektrophotometer kann anhand einer Standardreihe mit bekannter Konzentration die unbekannte Konzentration der Proteinextrakte bestimmt werden.

In eine transparente 96-well Mikrotiterplatte mit flachem Boden wurden 5 µl des zu messenden Extraktes bzw. 5 µl der Proben für die Standardreihe vorgelegt. Durch die Zugabe von 20 µl Reagenz S je Milliliter Reagenz A (alkalische Kupfertartrat-Lösung) wurde das Reagenz A' hergestellt. Dieser Schritt war erforderlich, da der für die Extrakte verwendete Lysepuffer II Detergenzien enthält. Die vorgelegten Proben wurden mit je 25 µl des Reagenz A' versetzt und so die erste Reaktion gestartet. Nach der Zugabe von 200 µl Reagenz B (Folin-Reagenz) wurden die Proben vorsichtig gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der entstandenen blauen Lösung wurde im Spektrophotometer *SpectraMAX 340 Microplate Reader* bei 750 nm gemessen. Vor der Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer (Laemmli) wurden die Proben der Messung entsprechend mit Lysepuffer II auf die gleiche Konzentration eingestellt, sodass für die SDS-PAGE gleiche Volumina aufgetragen werden konnten.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der endogenen sowie der ektopischen Expression bestimmter Gene bzw. klonierter cDNAs auf Proteinebene, wurde im Vorfeld des Western Blots eine Auftrennung der Proteine aus Gesamtzellextrakten durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die Proben zunächst durch Erhitzen in Gegenwart von SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) und DTT (Dithiothreitol, reduziert Disulfidbrücken) denaturiert. Neben der Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, übernimmt das anionische Detergenz SDS eine weitere wichtige Funktion in der SDS-PAGE. Durch die Anlagerung vieler negativ geladener SDS-Moleküle werden die Eigenladungen der Proteine maskiert. Dies resultiert in einer größenabhängigen, nach außen hin negativen Gesamtladung der SDS-Protein-Komplexe, sodass diese zur Anode wandern und eine Auftrennung der Proteine näherungsweise nach ihrer Größe gewährleistet ist.

Probenvorbereitung

Eine konfluente 6 cm Kulturschale wurde mit PBS gewaschen und daraufhin möglichst vollständig vom Überstand befreit. Wenn keine Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgen sollte, wurden die Zellen in 250 µl 2x SDS-Probenpuffers (Laemmli) mit einem Zellschaber abgeschabt und das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Sofern eine Proteinbestimmung (Kapitel 3.2.3) gewünscht war, konnten die Zellen nicht direkt in Laemmli-Puffer geerntet werden, da dessen Bestandteile den kolorimetrischen Assay stören würden. In diesem Fall wurden die Zellen in 200 µl Lysepuffer II (RIPA Puffer, siehe ChIP, Kapitel 2.3.2) abgeschabt und das errechnete Lysatvolumen erst nach der Messung mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Durch Zugabe der Nuklease Benzonase und 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurden

DNA und RNA verdaut. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine durch fünfminütiges Erhitzen bei 95 °C.

Herstellung des diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gels

Zunächst wurde das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. zwei Drittel der Gießkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Nach erfolgter Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgeschüttet und der obere Teil der Kammer mit Wasser gespült. Dann wurde das Sammelgel gegossen und der Kamm eingeschoben.

Zur Herstellung des Trenngels wurde eine 20 % Trenngellösung mit Tris-SDS-Puffer auf die gewünschte Konzentration (8-12 %) verdünnt. Für das Sammelgel wurde eine 4 %-ige Stocklösung eingesetzt. Direkt vor dem Gießen wurde den Gellösungen APS (Starter, Stocklösung: 10 % (w/v) in H₂O) und TEMED (Katalysator) mit einer jeweiligen Endkonzentration von 0,1 % zugegeben.

Gelelektrophorese

Nach dem Einspannen des auspolymerisierten Gels in die Laufkammer, wurde diese mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde gezogen und die Geltaschen mit Puffer ausgespült. Anschließend wurde das Gel mit dem Marker (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*) und den zuvor aufgekochten Proben beladen. Die Proben wurden zunächst bei 0,3 mA/cm² einlaufen gelassen. Beim Erreichen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 0,4 mA/cm² erhöht.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Western Blot

Zur Überprüfung der endogenen Expression von Proteinen oder der ektopischen Expression der in dieser Arbeit klonierten Konstrukte auf Proteinebene (nach Transfektion bzw. Infektion) wurde eine antikörperbasierte Detektion mittels Western Blot durchgeführt.

Proteintransfer

Der Transfer der in einer SDS-PAGE (Kapitel 3.2.4) aufgetrennten Proteine auf eine Millipore Immobilon®-P PVDF Membran erfolgte abhängig von der Größe des zu detektierenden Proteins wahlweise im *SemiDry*- oder Tank-Blot System.

Für kleinere Proteine bis ca. 70 kDa (z. B. die PPARs und dnNCoR1) wurde das *SemiDry*-Verfahren (Halbtrockenblot) angewendet. Zwei Whatman-Filterpapiere wurden in 1x Towbin-Puffer getränkt und auf der Anodenplatte der Blotting-Kammer platziert. Nach der Aktivierung der PVDF-Membran durch Methanol (zur Minderung der Hydrophobizität) wurde diese in 1x Towbin-Puffer equilibriert und mit einer Pinzette auf die Whatman-Filterpapiere gelegt. Anschließend wurde das SDS-Gel (nur das Trenngel, das nach der Elektrophorese die Proteine enthält) in der Orientierung des Gellaufs auf der Membran platziert. Vor dem Aufsetzen der Kathodenplatte folgten zwei weitere in 1x Towbin-Puffer getränkte Whatman-Filterpapiere (Abbildung 22). Um einen vollständigen Transfer der Proteine sicher zu stellen, wurden nach jedem Zwischenschritt eventuell aufgetretene Luftblasen mit einem Western Blot Roller entfernt. Der Transfer erfolgte bei ca. 1,7 mA pro cm² Membranfläche für zwei Stunden.

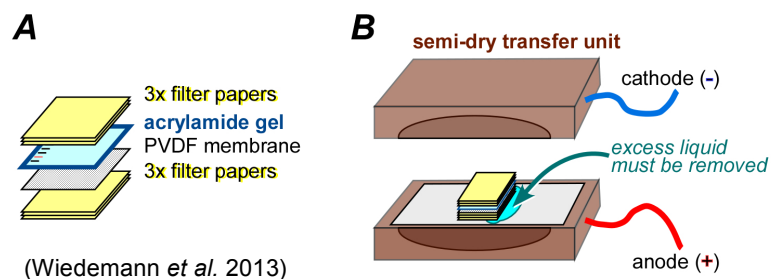


Abbildung 22: Aufbau des *SemiDry*-Blot Systems. Das SDS-Gel wird zwischen je zwei puffergetränkten Whatman-Filterpapieren kathodenseitig auf der Membran platziert. Aufgrund der negativen Ladung der Proteine im Gel (Maskierung der Eigenladungen durch SDS) wandern diese zur Anode und somit in Richtung der Membran.

Für den Transfer größerer Proteine ab ca. 70 kDa (z.B. Lamin B, NCoR1) wurde das Tank-Blot System bevorzugt, da es gegenüber dem *SemiDry* System eine höhere Transfereffizienz bei

großen Proteinen aufweist. Der Aufbau der einzelnen Schichten ist mit dem des *SemiDry*-Blot Verfahrens vergleichbar. Allerdings wurde der Zusammenbau zwischen zwei Gitterplatten und zwei Schwämmen gänzlich unter 1x Transferpuffer durchgeführt. Der Transfervorgang erfolgte in einer vollständig mit 1x Transferpuffer gefüllten Tank-Blot Kammer bei 350 mA (6,1 mA pro cm² Membranfläche) für zwei Stunden. Um ein zu starkes Erwärmen des Puffers zu verhindern, wurde der Vorgang im Kühlraum unter zusätzlicher Kühlung durch ein Eisbad durchgeführt.

Blocken und Inkubation des Primärantikörpers

Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran vor der Primärantikörper-Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver/ TBST_{0,1} geblockt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht in 5 % Milchpulver/ TBST_{0,1}. Der Primärantikörper wurde in der Regel 1: 1000 eingesetzt.

Inkubation des Sekundärantikörpers und Detektion

Die Membran wurde einmal kurz und dreimal für zehn Minuten in 1x TBST_{0,1} gewaschen, um den überschüssigen und nicht spezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Dann erfolgte die Inkubation des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers, in 1 % Milchpulver/ TBST_{0,1} verdünnt (i.d.R 1: 10.000), für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Membran kurz abtropfen gelassen und für eine Minute mit der Proteinseite nach unten in Luminata™ Forte Western HRP Substratlösung inkubiert. Die Detektion des bei der enzymatischen Reaktion emittierten Lichts erfolgte im Western Blot Dokumentationssystem *ChemiDoc™ MP* der Firma *Bio-Rad Laboratories*.

3.3.2 Chromatin-Immunpräzipitation qPCR (ChIP-qPCR)

Zur Untersuchung der Interaktion von Proteinen mit dem Chromatin insbesondere an regulatorischen Elementen des *ANGPTL4*-Locus wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt zunächst ein *Cross-Linking* (durch Formaldehyd) der DNA mit den Chromatin-assoziierten Proteinen sowie von Proteinen in direkter räumlicher Nähe. Die DNA-Protein Komplexe werden durch Sonifizierung in ca. 500 bp große DNA Fragmente geschert. Dann erfolgt die eigentliche Immunpräzipitation durch spezifische Antikörper, die gegen das interessierende Protein gerichtet sind. Durch das *Cross-Linking* werden die mit dem Protein assoziierten DNA-Fragmente immunpräzipitiert. Diese können, nach der Aufhebung der Kreuzvernetzungen und dem Verdau von RNA und Proteinen, aufgereinigt und mittels qPCR, Oligonukleotid-Microarray oder Sequenzierung analysiert werden. Die Anreicherung einer spezifischen DNA-Sequenz suggeriert eine Assoziation des interessierenden Proteins mit dieser Region des Genoms *in vivo*.

ChIP

Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde nach dem Protokoll von Adhikary und Müller aus dem Jahre 2013 (*In Vivo Studies of PPAR-Chromatin Interactions: Chromatin Immunoprecipitation for Single-Locus and Genomewide Analyses*) [6] durchgeführt.

Allerdings wurde eine 10 %-ige, methanolfreie Formaldehyd-Lösung zur Fixierung der Zellen verwendet. Das Medium der auf 15 cm Zellkulturschalen kultivierten Zellen wurde vor der Behandlung auf 9 ml reduziert, sodass für die gewünschte Konzentration eine geringere Substanzmenge der verwendeten Stimuli wie etwa TGF β erforderlich war. Zusätzlich konnten hierdurch für die Fixierung mit 1 % Formaldehyd und das anschließende Quenchen mit 125 mM Glycin konstante Volumina verwendet werden. Um im selben Experiment Antikörper verschiedener Isotypen einsetzen zu können, wurde stets ein 50: 50 Gemisch aus Protein A und Protein G Sepharose verwendet. Wie empfohlen, wurde das *QIAquick® PCR Purification* Kit der Firma *QIAGEN* zur Aufreinigung der DNA genutzt.

qPCR

Im Anschluss an die Aufreinigung der DNA aus den ChIP-Proben wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Wie für die RT-qPCR (Kapitel 3.2.2) wurde hierzu der *ABsolute™ qPCR SYBR Green Mix* der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Das Messprinzip sowie das Temperaturprogramm der qPCR sind somit äquivalent. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze unterscheidet sich hingegen und kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

Komponente	Volumen
2x <i>ABsolute™ qPCR SYBR Green</i>	5 μ l
Primermix (forward und reverse) 10 μ M	0,5 μ l
Wasser	3,5 μ l
DNA Template aus ChIP	1 μ l

Tabelle 23: *ChIP-qPCR-Reaktionsansatz pro well einer 96-well Platte*

Die spezifische DNA-Anreicherung nach der Präzipitation mit dem gewählten Antikörper wurde als % Input berechnet. Zur Berechnung des Fehlers wurde der Gauß'sche Fehler unter Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung ermittelt.

Für eine Input-Probe, die 1 % des eingesetzten löslichen Chromatins repräsentiert, ergibt sich der % Input-Wert der Probe und der dazugehörige Fehler wie folgt:

$$Anteil_{Input} [\%] = \frac{1}{2^{(Ct_{Probe} - Ct_{Input})}} \quad SD_{ges} = Anteil_{Input} \cdot \ln(2) \cdot \sqrt{SD_{Probe}^2 + SD_{Input}^2}$$

3.3.3 Interaktom-Analysen mittels RIME-Protokoll von Active Motif

Zur Identifikation des Faktors, der bei einer Behandlung mit inversen PPAR β/δ Agonisten zum Kernrezeptor rekrutiert wird, wurde das RIME-Protokoll (*Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins*) der Firma Active Motif eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein spezielles Protokoll, das auf dem Prinzip der ChIP-Massenspektrometrie basiert. Diese Technik kann zur Identifikation von transkriptionellen Co-Faktoren und Chromatin assoziierten Proteinen genutzt werden. Die Immunpräzipitation des Zielproteins PPAR β/δ sowie die massenspektrometrische Analyse der präzipitierten Proteine wurde von der Firma Active Motif durchgeführt. Die vorbereitenden Arbeitsschritte wie die Behandlung der Zellen, das *Cross-Linking* durch Formaldehyd und das Schockgefrieren der Zellpellets wurde in Anlehnung an das Zellfixierungs-Protokoll der Firma Active Motif selbst durchgeführt.

Behandlung und Fixierung der Zellen

Die Zellen wurden auf 15 cm Kulturschalen bis zu fast vollständiger Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde auf 9 ml reduziert und die Zellen für 30 Minuten behandelt (wahlweise DMSO, 300 nM PT-S264 oder 1 μ M L165,041). Zur Fixation wurde ein Gemisch aus 1 ml 10 %-igem methanolfreiem Formaldehyd und 100 μ l eines 100x Fixations-Mixes (siehe unten) pro Schale ins Medium gegeben. Nach einer achtminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fixierung der Zellen durch Zugabe von 530 μ l einer 2,5 M Glycin-Lösung (Endkonzentration: 125mM) und weitere fünf Minuten Inkubation gestoppt. Die Zellen wurden zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber geerntet und in eine 15 ml Schraubröhre überführt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 800 x g und 4 °C wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in 10 ml eiskaltem PBS mit 0,5 % NP-40 resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Bei einem zweiten Waschschrift wurde dem PBS/NP-40 der Protease-Inhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Versand an Active Motif auf Trockeneis wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

100x Fixations-Mix (100 μ l pro 15 cm Schale)

1 M NaCl

10 mM EDTA, pH 8.0

500 mM HEPES, pH 7.9

ad 100 μ l Wasser (pro Schale)

3.4 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Arbeiten mit Zelllinien wurden ausnahmslos unter Sterilbänken durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden stets autoklavierte oder steril verpackte Materialien verwendet. In regelmäßigen Abständen von ca. vier Wochen wurde ein PCR-basierter Mycoplasmen-Test durchgeführt. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurde die betreffende Kultur umgehend entsorgt um weitere Verschleppungen der Kontamination zu vermeiden.

3.4.1 Verwendete Zelllinien

Kommerziell erhältliche Zelllinien:

Caki-1: McCoy's 5A Medium

ATCC[®] HTB-46[™], Teddington (UK)

Die Zelllinie Caki-1 ist eine humane Zelllinie, die aus einer Haut-Metastase des klarzelligen Nierenkarzinoms eines 49-jährigen Patienten etabliert wurde.

MDA-MB231-*luc2* Bioware[®] Ultra: McCoy's 5A Medium

Caliper, Waltham (USA)

Bei der Zelllinie MDA-MB231-*luc2* handelt es sich um eine humane Brustkrebszelllinie (Adenokarzinom), die stabil das *Firefly Luciferase* Gen exprimiert (*luc2*). Im Zuge ihrer Etablierung wurde die Zelllinie MDA-MB231 mit Lentiviren (pGL4 *luc2*) transduziert, die das Luciferase 2 Gen unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin C Promotors enthielten ^[40]. Die ursprüngliche Zelllinie MDA-MB231 ist eine aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin mit Adenokarzinom abgeleitete Brustkrebszelllinie.

φNX-eco (Phi NX): DMEM Medium

Nolan Labor ^[139]

Die Verpackungszelllinie φNX-eco basiert auf der Zelllinie HEK293T (*human embryonic kidney*). Durch die Expression von *Gag-Pol* und *Env* Proteinen ermöglicht sie die Produktion von Retroviren ^[208]. Diese können zur Transduktion humaner Zelllinien verwendet werden, die exogen den murinen ecotropen Rezeptor Slc7a1 exprimieren.

In unserem Labor etablierte Zelllinien/ Klone:

MDA-MB231-*luc2* *ecoR*

Mitarbeiter der AG Müller/ Adhikary

MDA-MB231-*luc2* Zellen wurden stabil mit dem murinen ecotropen Rezeptor Slc7a1 transfiziert um die abgeleitete Zelllinie MDA-MB231-*luc2* *ecoR* zu erhalten.

MDA-MB231-*luc2* 2B3 PPAR β/δ KO

Masterarbeit Nathalie Legrand ^[155]

Der Klon 2B3 wurde durch einen CRISPR/Cas9 vermittelten *Knockout* von PPAR β/δ in MDA-MB231-*luc2* Zellen im Zuge der eigenen Masterarbeit generiert.

MDA-MB231-*luc2* 2B3 PPAR β/δ KO *ecoR*

Masterarbeit Nathalie Legrand ^[155]

Durch die stabile Transfektion des murinen ecotropen Rezeptors Slc7a1 wurde die Zelllinie MDA-MB231-*luc2* 2B3 PPAR β/δ KO *ecoR* etabliert, die für retrovirale Infektionen verwendet werden kann. Damit bildet sie die Basis für einen funktionellen Screen von PPAR β/δ -Mutanten.

3.4.2 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Caki-1 Zellen sowie der MDA-MB231-*luc2* Zellen und aller von dieser Zelllinie abgeleiteten Zellen erfolgte auf 10 cm Kulturschalen in 10 ml McCoy's 5A Medium. Für die ϕ NX-*eco* Zellen wurde hingegen DMEM Medium verwendet. Beide Grundmedien wurden standardmäßig mit 10 % (v/ v) fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % (v/ v) Penicillin (10.000 Units/ ml)/ Streptomycin (10 mg/ml) versetzt. Sowohl die Stammpopulation auf den 10 cm Kulturschalen als auch die für Experimente ausgesäten Zellen wurden in CO₂-begasbaren Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

3.4.3 Passagieren von Zellen

Die Caki-1 Zellen sowie die MDA-MB231-*luc2* Zellen und sämtliche von dieser Zelllinie abgeleiteten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90-100% passagiert. Da eine zu hohe Konfluenz der ϕ NX-*eco* Zellen gemäß Angaben des Nolan-Labors zu einer Verminderung ihrer Fähigkeit zur Produktion von Viren führt ^[209], wurden diese stets bereits bei einer Konfluenz von 70-80% passagiert.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt. Um abgeschwommene tote Zellen zu entfernen und die Inhibition des Trypsins durch Überbleibsel des im Medium enthaltenen FCS zu vermeiden, erfolgte ein Waschschriff mit PBS. Das PBS wurde ebenfalls abgesaugt und es wurde 1 ml einer 0,05 %-igen Trypsin/ EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Die Serin-Protease Trypsin spaltet Proteine des Zell-Zell-Adhäsionsapparates und kann daher verwendet werden, um adhärenente Zellen von der Zellkulturschale zu lösen und zu vereinzeln. Da die enzymatische Spaltung bei einer Temperatur von 37 °C effizienter abläuft, wurde die Kulturschale einige Minuten in den Inkubator gestellt. Um die Schädigung der Zellen durch eine zu lange Trypsin-Behandlung zu vermeiden, wurde mehrmals kontrolliert, wann die Ablösung der Zellen beginnt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 9 ml des jeweiligen Mediums gestoppt und die Zellen konnten mit einer Pipette vorsichtig von der Schale abgespült und in eine 15 ml Zentrifugenröhre überführt werden. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und im gewünschten Verhältnis auf eine frische Kulturschale gegeben. Das Volumen wurde mit frischem Medium auf 10 ml aufgefüllt.

3.4.4 Aussäen von Zellen für die Behandlung

Das Vorgehen beim Aussäen von Zellen entsprach bis zur Vereinzelung der Zellen durch Auf- und Abpipettieren dem Passagieren von Zellen (Kapitel 3.4.3). Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß eine 1:10-Verdünnung der Zellsuspension hergestellt, von der je 10 µl auf jede Seite der Zählkammer aufgetragen wurden. Die vier Eckquadrate der Zählkreuze wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Jedes dieser Quadrate entspricht einem Volumen von 0,1 µl, sodass sich die Zellzahl pro µl in der Zellsuspension nach der folgenden Formel ergibt: *Mittelwert der Zellen pro Quadrat x 10 x Verdünnungsfaktor = Zellzahl/ µl*

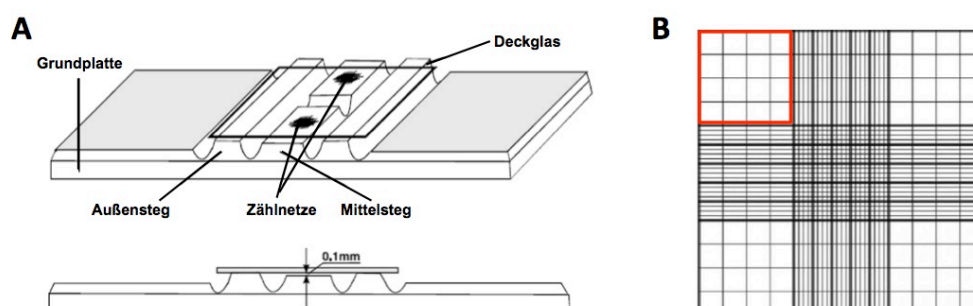


Abbildung 23: Neubauer Zählkammer. A) Schematischer Aufbau einer Neubauer-improved Zählkammer, doppelte Ausführung. Je 10 µl einer Zellsuspension werden zwischen Deckglas und Mittelsteg aufgetragen. B) Zählkreuz einer Neubauer-improved Zählkammer. Beim Zählvorgang werden die vier hellen Eckquadrate des Zählkreuzes ausgezählt. Ein Großquadrat (rot markiert) entspricht einem Volumen von 0,1 µl. Quelle: modifiziert aus LO Laboroptik Ltd; Laborshop24 GmbH

Das Aussäen der Zellen für Experimente erfolgte auf 6-well Platten in 2 ml McCoy's 5A/ 10 % FCS. Für die Behandlung mit PPAR-Liganden und anderen Substanzen wurden 2×10^5 Zellen pro 6-well ausgesät. Der Behandlungszeitraum betrug sechs Stunden. Anschließend wurden die Zellen für die RNA-Isolation (Kapitel 3.2.1) mit darauffolgender RT-qPCR (Kapitel 3.2.2) geerntet.

3.4.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Kryokonservierung

Die längerfristige Lagerung der Zelllinien erfolgte in Tanks mit flüssigem Stickstoff. Zur Kryokonservierung wurde eine konfluente 10 cm Schale zunächst mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Trypsinierung von der Schale abgelöst. Nach dem Abstoppen der Trypsinierung mit 10 ml Medium wurden die Zellen in eine 15 ml Zentrifugenröhre gegeben und bei $300 \times g$ für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 4-6 ml Einfriermedium (übliches Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert und je 1 ml der Zellsuspension in ein Einfrier Röhrchen überführt. Für den Einfriervorgang bei -80°C wurde ein Mr. Frosty™ Gefrierbehälter verwendet. Dieser ermöglicht die langsame Abkühlung der Zellen bei einer Kühlrate von ca. -1°C pro Minute und verhindert so das Platzen der Zellen durch zu schnelles Einfrieren. Nach 24 h konnte die Überführung in den Stickstofftank zur langfristigen Lagerung erfolgen.

Auftauen

Beim Auftauen der Zellen war auf ein rasches Arbeiten zu achten, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO toxisch auf die Zellen wirkt. Die Zellen wurden daher zügig durch Erwärmen des Einfrier Röhrchens in der Hand oder im Inkubator aufgetaut und in eine mit 9 ml Medium vorbereitete 15 ml Zentrifugenröhre überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei $300 \times g$ wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in 6 ml frischem Medium resuspendiert und auf eine 6 cm Kulturschale gegeben. Sobald sich die Zellen abgesetzt hatten und adhärent geworden waren, wurde ein Waschschriff mit PBS durchgeführt um Überbleibsel des im Einfriermedium enthaltenen DMSO vollständig zu entfernen. Anschließend wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben. An den folgenden Tagen wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf ihre Vitalität überprüft und gegebenenfalls abgeschwommene tote Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Anfänglich wurden die Zellen in einem niedrigeren Splitverhältnis passagiert bis sie sich vollständig vom Auftauvorgang erholt hatten und wieder die gewohnte Wachstumsrate erreicht hatten.

3.5 Transfektionstechniken und CRISPR/Cas9

3.5.1 CRISPR/Cas9 zur Generierung von *NCOR1 Knockout* Zellen

Das CRISPR/Cas9 System (CRISPR = *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) basiert auf einem antiviralen Abwehrmechanismus des bakteriellen Immunsystems. Die CRISPRs bilden dabei eine Art Bibliothek aus Sequenzen potentieller Angreifer. Wird das Bakterium von einem „bekannten“ Virus infiziert, so wird dieses erkannt und das virale Genom wird von den Cas-Proteinen (CRISPR-associated proteins) zerschnitten. Dieses System macht sich die Molekularbiologie zunutze, um *in vivo* gezielt Veränderungen an der DNA vorzunehmen (*Genome Editing/ Engineering*) ^[106, 171].

Funktionsweise des Alt-R® CRISPR-Cas9 Systems

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Generierung eines *NCOR1 Knockouts* in MDA-MB231-*luc2* Zellen mittels CRISPR/Cas9 angestrebt. Der gewählte Ansatz, das Alt-R® CRISPR-Cas9 System der Firma *Integrated DNA Technologies* (IDT), arbeitet mit Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP). Durch die Hybridisierung einer *target*-spezifischen crRNA (CRISPR RNA) mit der universell eingesetzten tracrRNA entsteht eine crRNA:tracrRNA Duplex. Diese wird anschließend mit dem Cas9 Protein inkubiert, sodass sich ein Ribonukleoprotein-Komplex formiert, der in Zellen transfiziert werden kann. In der Zelle wird die aus *S. pyogenes* stammende Cas9 Nuklease (*CRISPR associated Protein 9*) von der Protospacer-Sequenz der crRNA:tracrRNA Duplex zur jeweiligen spezifischen Ziellokalisation in der genomischen DNA geführt und induziert Doppelstrangbrüche. Das crRNA Protospacer-Element erkennt ca. 20 Nukleotide am Gegenstrang der direkt *downstream* angrenzenden NGG PAM Site (*Protospacer Adjacent Motif*). Diese fungiert als Bindestelle der Cas9 Nuklease, weshalb ihr Vorhandensein an der richtigen Position für das Schneiden der DNA unerlässlich ist ^[113]. Der anschließend aktiv werdende DNA-Reparatur Mechanismus der nicht-homologen Endverknüpfung (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ) ist fehleranfällig und führt häufig zu Insertionen oder Deletionen. Diese Mutationen können in einer Verschiebung des Codon-Leserasters (*Frameshift*) resultieren, was zur Folge hat, dass das offene Leseraster verlassen wird und ein verfrühtes Stopp-Codon (statistisch gesehen alle 21 Codons) entsteht ^[106]. Auf diese Weise kann das CRISPR/Cas9 System zu einem *Knockout* des vom betroffenen Gen kodierten Proteins führen.

Hybridisierung von crRNA und tracrRNA

Mit Hilfe des Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA Design Tools von IDT wurden drei für das *NCOR1* Gen spezifische crRNAs erstellt. Die tracrRNA ist hingegen universell und für jeden Ansatz konstant. Um nach der Transfektion das Intaktsein der RNA und die erfolgreiche Aufnahme des

RNP-Komplexes in die Zellen überprüfen zu können, wurde eine ATTO™ 550 gelabelte tracrRNA gewählt, die eine Detektion am Fluoreszenz-Mikroskop ermöglicht. Nach dem Lösen der crRNAs auf 20 µM und der ATTO™ 550-tracrRNA auf 50 µM im mitgelieferten Duplexpuffer wurde der crRNA:tracrRNA Hybridisierungsansatz wie in Tabelle 24 dargestellt pipettiert, um eine finale Duplexkonzentration von 1 µM zu erreichen.

Komponente	Volumen
NCOR1 crRNA (20 µM)	5 µl
ATTO™ 550-tracrRNA (50 µM)	2 µl
Nuklease-freier Duplex-Puffer	93 µl

Tabelle 24: Zusammensetzung eines crRNA:tracrRNA Hybridisierungsansatzes

Zur Bildung der crRNA:tracrRNA Duplex wurden die beiden RNAs durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C und langsames Abkühlen (0,1 °C pro Sekunde) miteinander hybridisiert.

Komplexbildung und Transfektion der RNP-Komplexe

Für die Komplexbildung wurden die crRNA:tracrRNA Duplexe im Verhältnis 1:1 mit der *Alt-R® S.p. HiFi Cas9* Nuklease (in Opti-MEM™ auf 1 µM vorverdünnt) in Opti-MEM™ für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tabelle 25).

Komponente	Volumen
crRNA:tracrRNA Duplex (1 µM)	7,5 µl
Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuklease (1 µM)	7,5 µl
Opti-MEM™	110 µl

Tabelle 25: Komponenten für die Bildung des RNP-Komplexes, 24-well

Die Transfektion der RNP-Komplexe erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagens Lipofectamine® 2000, dessen Funktionsweise auf dem Prinzip der Lipofektion basiert. Diese Technik nutzt zur Einbringung von Transfektionsmaterial in Zellen Liposomen, die leicht mit der Zellmembran verschmelzen können, da sie beide aus Phospholipid-Bilayern bestehen^[77]. Lipofectamine® 2000 enthält positiv geladene Lipide, die in wässriger Lösung mit den negativ geladenen Nukleinsäuren Komplexe bilden^[57]. Neutrale Helfer-Lipide vermitteln die Fusion der entstehenden kationischen Liposomen mit der negativ geladenen Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran. Auf diese Weise kann die elektrostatische Abstoßung zwischen negativ geladenen Nukleinsäuren und ebenfalls negativ geladener Zellmembran überwunden werden und das Transfektionsmaterial kann effizienter in die Zielzelle eingebracht werden.

Am Vortag der Transfektion wurden $1,5 \times 10^5$ MDA-MB231-*luc2* Zellen auf 24-*well* Platten in 500 μ l McCoy's 5A/ 10 % FCS ausgesät. Zur Herstellung des Transfektionsmixes wurden dem Ansatz des RNP-Komplexes 119 μ l Opti-MEM™ und 6 μ l Lipofectamine® 2000 zugegeben. Der vollständige Transfektionsmix wurde gründlich gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Formation der Liposomen zu ermöglichen. Bevor der Transfektionsmix vorsichtig auf die Zellen getropft wurde, erfolgte ein Wechsel auf Mangelmedium mit 2 % FCS. Zur Verbesserung der CRISPR-Effizienz wurde dem Medium Azidothymidin (AZT) zugegeben [313]. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung von Lipofectamine® 2000 wurden die Zellen nach vierstündigem Verbleib im Inkubator einmal mit PBS gewaschen und mit frischem McCoy's 5A/ 10 % FCS Medium versorgt. Um die Wahrscheinlichkeit für einen vollständigen *Knockout* zu erhöhen, erfolgte nach 48 Stunden eine zweite Transfektion.

Vereinzelung der Zellen zur Generierung von Einzelklonen

Da für spätere Experimente einheitliche Populationen von *NCOR1* KO Zellen erforderlich waren, wurden die Zellen zur Generierung von Einzelklonen weitere 48 Stunden nach der zweiten Transfektion vereinzelt. Die Zellen wurden mit 150 μ l einer 0,05 %-igen Trypsin/ EDTA-Lösung abgelöst, in 4,5 ml Medium resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurde eine starke Verdünnung der Zellsuspension hergestellt, sodass sich eine Konzentration von 0,67 Zellen pro μ l ergab. Eine 96-*well* Platte wurde mit 100 μ l konditioniertem McCoy's 5A/ 10 % FCS (konditioniert durch MDA-MB231-*luc2*) pro *well* vorbereitet und in jedes *well* wurde 1 μ l der stark verdünnten Zellsuspension pipettiert. Dieses Vorgehen ermöglichte eine hohe statistische Wahrscheinlichkeit für null oder eine Zelle pro *well*.

Nach einer mehrtägigen Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die einzelnen *wells* lichtmikroskopisch beurteilt und leere *wells*, sowie *wells* mit zwei oder mehr Klonen verworfen. Die Einzelklone der übrigen *wells* wurden weiter kultiviert und nach einigen Tagen auf das nächstgrößere *well*-Format umgesetzt. Dieses Vorgehen wurde wiederholt bis das Format einer 6-*well* Platte erreicht war.

Screening der Einzelklone auf *Knockout* von *NCOR1*

Zum Screening der Einzelklone auf einen erfolgreichen *Knockout* von *NCOR1* wurden Western Blots durchgeführt. Für die Ernte wurden drei Viertel der Zellen eines konfluenten 6-*wells* in ein neues 6-*well* überführt, während die übrigen Zellen in Kultur verblieben bis das Ergebnis des Screenings vorlag. Nach dem erneuten Erreichen der Konfluenz erfolgte die Ernte der Zellen in 125 μ l 2x SDS-Probenpuffer mit 1:1000 Benzonase bzw. 100 μ l Lysispuffer II (RIPA Puffer, siehe ChIP, Kapitel 2.3.2) mit je 1:1000 Protease-Inhibitor-Cocktail und Benzonase. Es erfolgte eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4) gefolgt von einem Western Blot (Kapitel 3.3.1). Als Kontrolle wurde ein Extrakt der Parentalzelllinie MDA-MB231-*luc2* aufgetragen.

***In vitro* RNP-Test**

Um die Funktionalität der *NCOR1* crRNAs im RNP-Komplex zu testen, wurde ein *in vitro* RNP-Test durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein ca. 900 bp großes Fragment, das die Zielsequenz der *NCOR1* crRNAs enthält, mittels PCR (Kapitel 3.1.3) aus genomischer DNA (von MDA-MB231-*luc2* Zellen) amplifiziert. Äquivalent wurde mit einem Fragment des *HPRT* Gens verfahren, sodass die im *Alt-R® CRISPR-Cas9 Control* Kit enthaltenen Kontroll-crRNAs gegen *HPRT* als Positivkontrolle eingesetzt werden konnten. Die Hybridisierung der crRNA:tracrRNA Duplex erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Nukleaseaktivität der Cas9 benötigt zweiwertige Magnesiumkationen als Co-Faktor. Während diese bei der Anwendung in der Zellkultur im zellulären Milieu zur Verfügung stehen, war es für den *in vitro* RNP-Test erforderlich, dem Opti-MEM™ bei der Verdünnung der Cas9 Nuklease Magnesiumchlorid zuzugeben. Zur Bildung des RNP-Komplexes wurden die Komponenten wie in Tabelle 26 angegeben vereinigt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Komponente	Volumen
crRNA:tracrRNA Duplex (1 µM)	6,1 µl
Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuklease (6,1 µM)	1 µl
Opti-MEM™ mit 10 mM MgCl ₂	10,4 µl

Tabelle 26: Komponenten für die Bildung des RNP-Komplexes im *in vitro* RNP-Test

Anschließend wurden ca. 200 ng des amplifizierten *NCOR1* bzw. *HPRT* Fragments (in 2,5 µl) hinzugegeben. Während einer 1,5-stündigen Inkubation bei 37 °C konnte die *in vitro* Reaktion ablaufen. Um die Beeinflussung des Laufverhaltens der DNA-Fragmente durch Komponenten des RNP-Komplexes auszuschließen, wurde vor der Analyse in einer Agarose-Gelelektrophorese ein Verdau von Proteinen und RNA durchgeführt. Hierzu wurden die Proben mit 10 µg Proteinase K und 5 µg RNase A versetzt und für 30 Minuten bei 65 °C inkubiert.

3.5.2 Polyethylenimin (PEI) - Transfektion

Zur Überprüfung der prinzipiellen Exprimierbarkeit der auf den klonierten Plasmiden kodierten cDNAs wurden die Konstrukte transient in HEK293 Zellen transfiziert. Diese Zelllinie zeichnet sich im Gegensatz zu Caki-1 oder MDA-MB231-*luc2* durch eine besonders hohe Transfektionseffizienz aus. Der Anteil erfolgreich transfizierter Zellen lag in der Regel zwischen 80 und 90 %, sodass ohne einen weiteren Selektionsschritt bereits einige Stunden nach der Transfektion die Ernte von Gesamtzellextrakten erfolgen konnte. Anschließend wurde mittels Western Blot (Kapitel 3.3.1) die Expression auf Proteinebene überprüft.

Die PEI-Transfektion ist eine Methode, die es erlaubt, Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen einzubringen. Dabei macht sie sich die Eigenschaft des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI) zunutze, mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA zu interagieren. Es bilden sich Komplexe, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Die HEK293 Zellen wurden am Vortag auf 6-well Platten ausgesät und wiesen zu Beginn der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70-80 % auf. Es wurde eine Lösung der zu transfizierenden DNA in PBS hergestellt, die nach gründlichem Mischen mit einer PEI/ PBS-Lösung vereinigt wurde.

DNA-PBS-Mix (pro 6-well)

4 µg Plasmid-DNA
ad 100 µl PBS

PEI/ PBS-Lösung (pro 6-well)

5 µl PEI-Stammlösung
95 µl PBS

Der nun vollständige Transfektionsmix wurde fünf Sekunden gevortext. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, während der sich die Komplexe bildeten. Diese Zeit wurde genutzt, um einen Mediumwechsel auf serumreduziertes Medium (DMEM/ 2 % FCS) durchzuführen. Der Transfektionsmix wurde vollständig auf die Zellen gegeben (200 µl pro 6-well. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung von PEI, wurden die Zellen nach vierstündigem Verbleib im Inkubator mit PBS gewaschen und mit frischem DMEM/ 10% FCS Medium versorgt. Nach einer ca. 42-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Ernte der Gesamtzellextrakte in 400 µl 2x SDS-Probenpuffer (mit 1:1000 Benzonase).

3.5.3 Virenproduktion in Phoenix-eco (φNX-eco) Zellen

In Vorarbeiten der AG Müller/ Adhikary (B. Wilke, C. L. Bretscher, S. Zielke) wurden durch PCR-Mutagenese (*Site-directed Mutagenesis*) zahlreiche pMSCVbsd-PPARD Mutanten generiert. Diese Konstrukte sowie die im Zuge dieser Arbeit hergestellten neuen Mutanten (Kapitel 2.4.3) und neu klonierten Konstrukte (Kapitel 2.4.3) sollten durch retrovirale Infektion stabil in die genomische DNA der Zielzellen integriert werden. Hierzu wurden zunächst Virusüberstände in der Packzelllinie Phoenix-eco hergestellt ^[139]. Diese basiert auf der Zelllinie HEK293T und weist daher ebenfalls eine hohe Transfektionseffizienz auf. Durch die Expression von *Gag-Pol* und *Env* Proteinen ermöglicht sie die Produktion von Retroviren. Diese können zur Transduktion humaner Zelllinien verwendet werden, die stabil mit dem murinen ecotropen Rezeptor Slc7a1 transfiziert wurden.

Die Kultivierung der Phoenix-eco Zellen erfolgte auf 10 cm Kulturschalen in 10 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (siehe Kapitel 3.4.2). Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Konstrukte mittels PEI-Transfektion (Kapitel 3.5.2, für 10 cm Schale: 20 µg Plasmid in 500 µl PBS und 25 µl PEI in 475 µl PBS) in die Zellen eingebracht. Nach vier Stunden wurde das Medium abgesaugt und 7,5 ml DMEM/ 10 % FCS wurden auf die Zellen gegeben. Es folgte eine

24-stündige Inkubation im Zellkulturinkubator zur Produktion der Viren. Anschließend wurde der Überstand in eine 15 ml Zentrifugenröhre überführt und für fünf Minuten bei 800 x g abzentrifugiert, um ein Verschleppen von Phoenix-eco Zellen zu vermeiden. Die Virusüberstände wurden in 3 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt für die retrovirale Infektion der Zielzellen eingesetzt (Kapitel 3.5.4). Die Phoenix-eco Zellen wurden erneut mit 7,5 ml frischem DMEM/ 10 % FCS versorgt, sodass nach weiteren 24 Stunden eine zweite Virusernte erfolgen konnte.

3.5.4 Retrovirale Infektion

Im Vorfeld der retroviralen Infektion wurden die zu infizierenden MDA-MB231-*luc2* und MDA-MB231-*luc2 PPARD* KO Zellen stabil mit dem murinen ecotropen Rezeptor transfiziert (durch Mitarbeiter der AG Müller/ Adhikary bzw. in der eigenen Masterarbeit durchgeführt). Dieser wird in menschlichen Zellen nicht exprimiert, was mit dem gewählten retroviralen Expressionssystem ein Arbeiten unter nicht-humanpathogenen Bedingungen (Sicherheitsstufe 1) ermöglicht.

Um eine erfolgreiche Infektion der Wirtszellen zu gewährleisten, war deren Proliferation erforderlich. Am Vortag der Infektion wurden daher $2,5 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Schale ausgesät, sodass die Konfluenz bei Zugabe der Virusüberstände um 50 % lag und die Proliferation der Zellen nicht zu sehr durch die Kontaktinhibition benachbarter Zellen gestört wurde. Das Medium wurde abgesaugt und durch den Infektionsmix (Virenproduktion siehe Kapitel 3.5.3) ersetzt.

Infektionsmix

3 ml Virusüberstand (frisch produziert oder aus -80 °C Lagerung)

2 ml McCoy's 5A / 10 % FCS Medium

5 µl Polybren (4 mg/ ml)

Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Selektion der erfolgreich infizierten Zellen gestartet. Hierzu wurde der Infektionsmix abgesaugt und durch McCoy's 5A/ 10 % FCS Medium mit Blastidin in einer Endkonzentration von 10 µg/ ml ersetzt. Die Zellen wurden in den Folgetagen regelmäßig unter dem Mikroskop beurteilt und gegebenenfalls abgeschwommene tote Zellen wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Nach ca. sieben Tagen konnte anhand der Sterbekontrolle von einer vollständigen Selektion ausgegangen werden. Die Zellen wurden allerdings darüber hinaus dauerhaft in Selektionsmedium kultiviert. Während die nicht-resistenten Zellen starben und abschwammen, teilten sich die resistenten Zellen weiter, wodurch Bereiche unterschiedlicher Zelldichten entstanden. Daher wurden die Zellen nach ca. zehn Tagen von der Schale abgelöst und auf eine neue 10 cm Kulturschale umgesetzt, um eine gleichmäßige Konfluenz zu ermöglichen. War diese vollständig erreicht, so konnten die Zellen für die Behandlung mit PPAR-Liganden oder anderen Substanzen ausgesät werden.

4 Ergebnisse

4.1 Modell-Locus und Auswahl von geeigneten Zellsystemen

Die Auswahl von geeigneten Zellsystemen ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der geplanten Ansätze. Abhängig von der jeweiligen Fragestellung und der experimentellen Herangehensweise können unterschiedliche Zellsysteme aufgrund ihrer Eigenschaften eine vielversprechende oder aber eher unvorteilhafte Basis für die Durchführung der Experimente bieten.

Das PPAR β/δ Zielgen *ANGPTL4* zeigte in genomweiten Studien unserer Arbeitsgruppe [7, 8] deutlich die stärkste Ligandenresponsivität im Vergleich zu anderen Zielgenen. Aufgrund seiner unterschiedlichen regulativen Elemente und der Interkonnektivität von PPAR β/δ und dem TGF β -Signalweg [128] bietet der *ANGPTL4* Locus eine ausgezeichnete Grundlage zur Untersuchung der dominanten Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten [8]. Weiterhin ergibt sich aus der Rolle des Genprodukts *ANGPTL4* bei der Invasion von Tumorzellen [8, 218] eine mögliche klinische Relevanz. Angesichts dieser Eigenschaften wird der *ANGPTL4* Locus als besonders geeigneter Modell-Locus für die Untersuchung der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten angesehen.

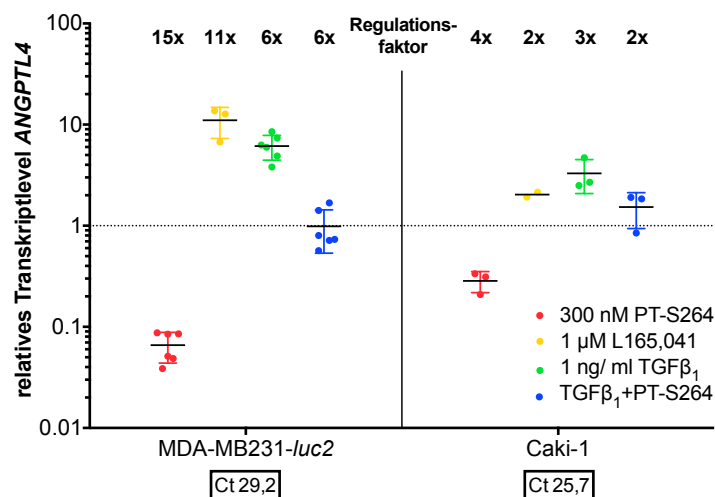


Abbildung 24: RT-qPCR, PPAR β/δ -Ligandenresponsivität in MDA-MB231-luc2 und Caki-1. MDA-MB231-luc2 und Caki-1 Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^5 auf 6-well Platten ausgesät. Am Tag darauf erfolgte eine sechsstündige Behandlung mit dem inversen PPAR β/δ -Agonisten PT-S264, dem Agonisten L165,041, TGF β_1 und TGF β_1 mit PT-S264. Die Lösungsmittel DMSO (PPAR β/δ -Liganden) und 0,1 % Fettsäurefreies BSA in PBS (TGF β_1) dienten als Kontrollbehandlung. Anschließend wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und für eine RT-qPCR eingesetzt. Die Abbildung zeigt das relative Transkriptlevel von *ANGPTL4* bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle. Die Normalisierung erfolgte (wie auch für die nachfolgenden RT-qPCR Experimente) anhand des Haushaltsgens *RPL27*. Der normalisierte basale Ct-Wert der Proben ist unterhalb der Namen der Zelllinien angegeben. Jeder Datenpunkt zeigt ein biologisches Replikat, jeweils errechnet aus drei technischen Replikaten.

Bereits in der eigenen Masterarbeit ^[155] wurden mehrere Zelllinien getestet, um ein geeignetes Zellsystem auszuwählen. Dazu wurden diese mit PPAR β/δ -Liganden behandelt, um sie auf die Ausprägung der transkriptionellen Regulation des Zielgens *ANGPTL4* zu untersuchen. Aus den behandelten Zellen wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer RT-qPCR eingesetzt. Sowohl die basale Expression als auch die Ligandenresponsivität des *ANGPTL4* Gens zeigten Unterschiede in verschiedenen Zelllinien ^[155]. Die Zelllinie MDA-MB231-*luc2* zeigte die stärkste Regulation der *ANGPTL4* Expression, sowohl durch den PPAR β/δ Agonisten L165,041 als auch durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264. Sie wies jedoch ein niedriges basales Transkriptlevel auf. In Caki-1 Zellen war die basale Expression deutlich höher, allerdings fiel die Regulation durch PPAR β/δ -Liganden schwächer aus. Abbildung 24 zeigt zusammenfassend mit mehreren biologischen Replikaten (jeweils aus drei technischen Replikaten errechnet) die im Laufe der Doktorarbeit generierten Daten zu den beiden Zelllinien MDA-MB231-*luc2* und Caki-1. Das basale Transkriptlevel liegt in Caki-1 Zellen ca. 11-fach höher als in MDA-MB231-*luc2*. Allerdings zeigen letztere mit 15-fach (inverser Agonist) und 11-fach (Agonist) eine deutlich stärkere Ligandenresponsivität, was sich auch bei der kombinierten Behandlung mit TGF β_1 und PT-S264 fortsetzt.

4.2 Auswirkungen auf Schritte des Transkriptionszyklus

4.2.1 Eingrenzung des betroffenen Schritts im Transkriptionszyklus

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe wiesen darauf hin, dass der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten ein noch unbekannter Mechanismus zugrunde liegt (Kapitel 1.6.1) ^[8]. Daher sollte zunächst eingegrenzt werden, an welchem Schritt des Transkriptionszyklus der Mechanismus ansetzt, um so Rückschlüsse auf dessen Funktionsweise ziehen zu können.

In Adhikary *et al.* 2013 ^[8] wurde beobachtet, dass der inverse PPAR β/δ Agonist ST247 ^[202] die Bindung der RNA-Polymerase II an den *ANGPTL4* Promotor verringert. Für nachfolgende Experimente sollte der inzwischen verfügbare, weiterentwickelte inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 ^[279] zum Einsatz kommen. Mittels *Scanning* ChIP-qPCR in Caki-1 Zellen wurde das Bindungsprofil der RNA-Polymerase II über den gesamten *ANGPTL4* Locus nach der Behandlung mit TGF β_1 , PT-S264 oder in Kombination analysiert. Wie Abbildung 25 zu entnehmen ist, zeigen vier verschiedene RNA-Polymerase II Antikörper (8WG16, 1C7, sc-9001 und sc-899) ein vergleichbares Muster. Während die Antikörper 8WG16 und 1C7 die CTD der RNA-Polymerase II Untereinheit RPB1 erkennen, liegt das Epitop der Antikörper sc-9001 und sc-899 im N-Ter-

minus von RPB1. Der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 führt zu einer verminderten Bindung der RNA-Polymerase II, die bereits am Transkriptionsstart einsetzt und sich über den gesamten Locus fortsetzt. Die erhöhte Anreicherung der Polymerase bei Gabe des aktivierenden Stimulus TGF β_1 kann durch PT-S264 effizient unterdrückt werden.

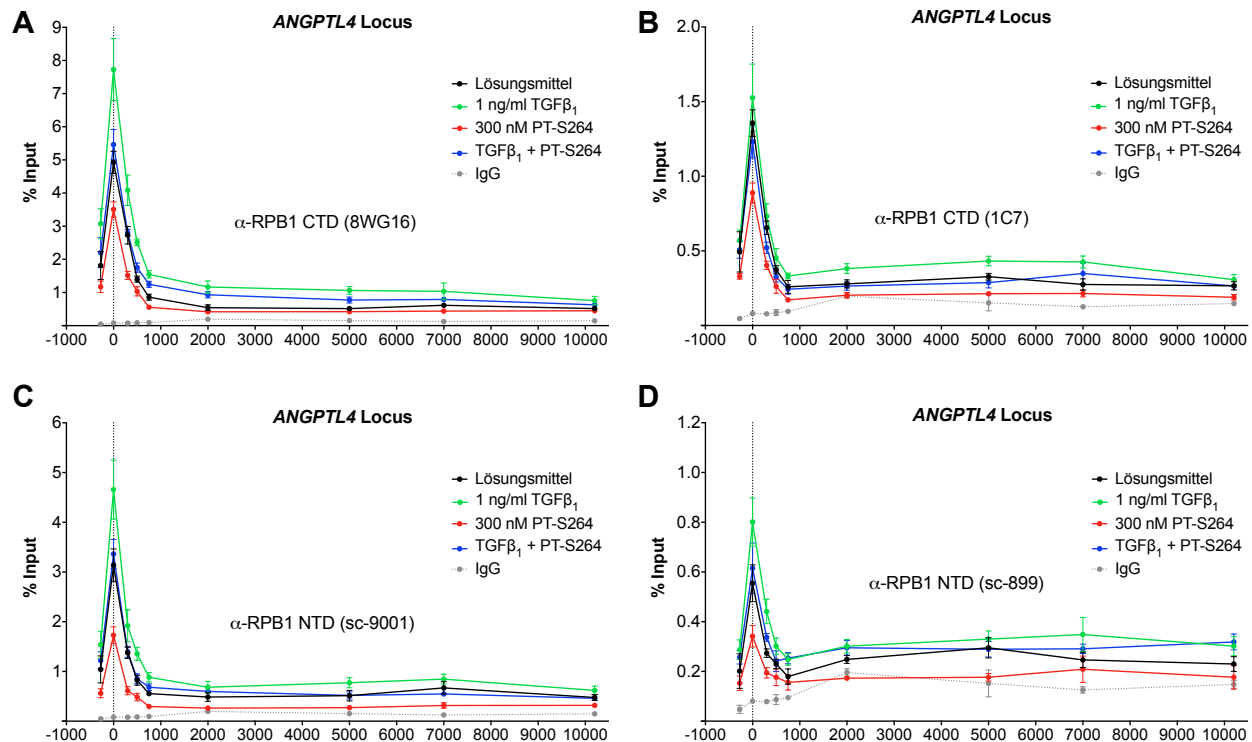


Abbildung 25: Scanning ChIP-qPCR, Untersuchung der RNA-Polymerase II Bindungsprofile am *ANGPTL4* Locus. Caki-1 Zellen wurden 30 Minuten mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264, TGF β_1 oder beiden Stoffen in Kombination behandelt. Anschließend wurde eine ChIP mit vier verschiedenen Antikörpern gegen die RNA-Polymerase II durchgeführt: A) 8WG16, B) 1C7, C) sc-9001, D) sc-899. Die Anreicherung von Regionen des *ANGPTL4* Locus in der präzipitierten DNA wurde mit mehreren, über den Locus verteilten Primerpaaren in qPCR-Messungen bestimmt. Zur Abschätzung des Hintergrund-Signals ist die Anreicherung der unspezifischen IgG-Kontrolle (aus einem Chromatin-Gemisch der vier Behandlungen) als graue gestrichelte Linie dargestellt. Die Daten zeigen ein repräsentatives Experiment.

In einem weiteren Scanning ChIP-qPCR Experiment wurden die Auswirkungen des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 auf das Bindungsprofil der RNA-Polymerase II mit den Effekten bekannter Transkriptionsinhibitoren verglichen. Hierzu wurden einerseits die beiden CDK9-Inhibitoren DRB und Flavopiridol eingesetzt, die den Übergang vom Promotor-proximalen Pausieren in die produktive Elongation (Kapitel 1.4.3) verhindern [23]. Andererseits wurde der Initiationsinhibitor Triptolid verwendet, der an die TFIIH-Unterheit XPB bindet und ihre ATPase Aktivität inhibiert [23]. Dadurch wird die ATP-abhängige Helikase-Aktivität von XPB, die für die Bildung der Transkriptionsblase erforderlich ist (Kapitel 1.4.2), gestört und es kann keine Initia-

tion erfolgen. Wie im vorherigen Experiment, erfolgte die Behandlung mit PT-S264 bzw. den Transkriptionsinhibitoren einzeln und in Kombination mit TGF β_1 .

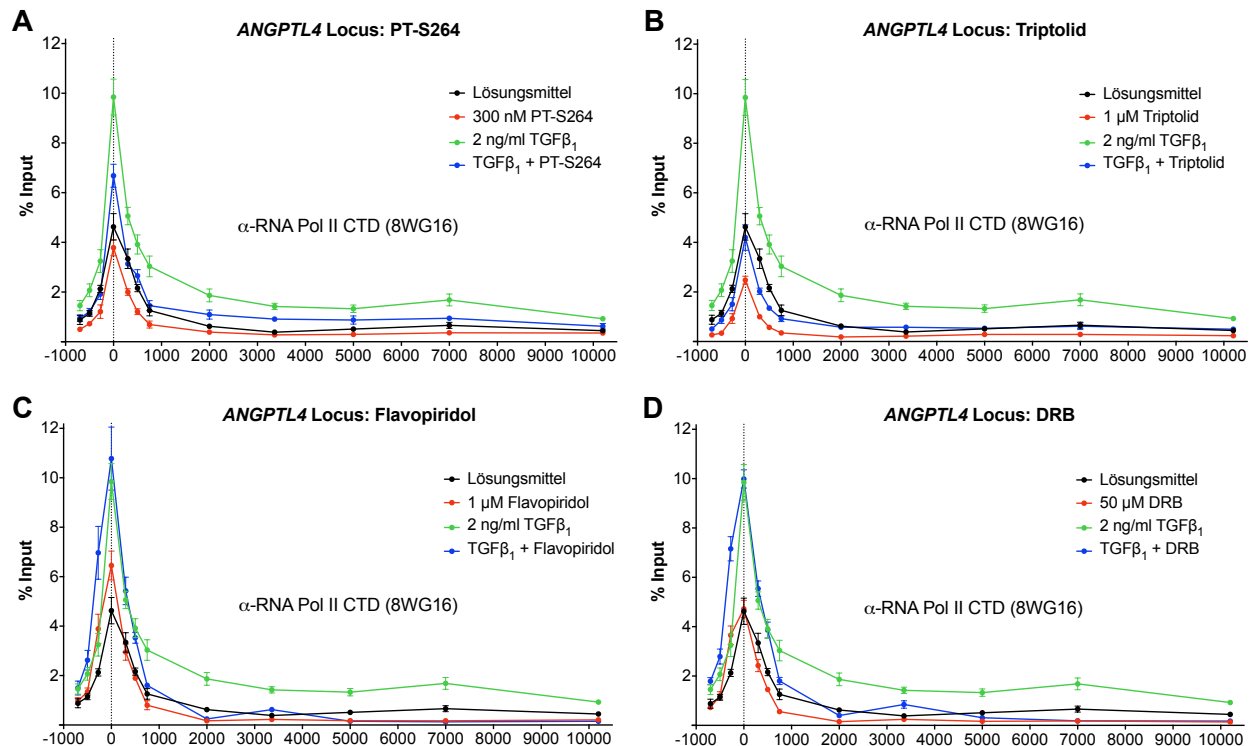


Abbildung 26: Scanning ChIP-qPCR, Vergleich der Auswirkungen von PT-S264 und von bekannten Transkriptionsinhibitoren auf das Bindungsprofil der RNA-Polymerase II. Caki-1 Zellen wurden 30 Minuten mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 (A) oder den Transkriptionsinhibitoren 1 μ M Triptolid (B), 1 μ M Flavopiridol (C), bzw. 50 μ M DRB (D) jeweils einzeln und in Kombination mit 1 ng/ml TGF β_1 behandelt. Die ChIP wurde mit dem RNA-Polymerase II CTD Antikörper 8WG16 durchgeführt. Anschließend erfolgte die Messung der Anreicherungen wie im vorherigen Experiment. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Der Vergleich der RNA-Polymerase II Bindungsprofile in Abbildung 26 zeigt, dass das Bindungsmuster in den PT-S264 (A) behandelten Zellen dem der Triptolid-Behandlung (B) ähnelt. Wie zuvor für PT-S264 beobachtet, ist mit dem Initiationsinhibitor eine Verminderung der RNA-Polymerase II Bindung beginnend am Transkriptionsstart zu verzeichnen. Bei den Elongationsinhibitoren Flavopiridol (C) und DRB (D) ist die Bindung der RNA-Polymerase am Transkriptionsstart unbeeinflusst bzw. steigt mit Flavopiridol sogar an. Der Signal-Peak am Transkriptionsstart ist bei beiden Substanzen insbesondere in Richtung stromaufwärts des TSS verbreitert und fällt in Richtung stromabwärts des TSS steiler ab als für PT-S264 und Triptolid beobachtet. Weiterhin ist ein Anstieg des Signals an den PPRES (+3300) im Vergleich zu den umliegenden Regionen (+2000 und +5000) bei den Flavopiridol und DRB behandelten Proben anzumerken.

4.2.2 Untersuchung der Phosphorylierung von Serin 2 und 5 der CTD

Die Phosphorylierungen der Serine 2 und 5 der RNA-Polymerase II RPB1 CTD-*Repeats* übernehmen, wie in Kapitel 1.4 erläutert, wichtige Funktionen im Verlauf des Transkriptionszyklus. Eine Störung dieser Modifikationen könnte das Passieren von Transkriptions-Checkpoints (z.B. Capping-Checkpoint: Ser5-P) blockieren und das Fortschreiten der Transkription verhindern. Nach dem Ablauf einer Transkriptionsrunde ist hingegen die Dephosphorylierung der RNA Pol II CTD erforderlich, um einen erneuten Eintritt der Polymerase in den Reinitiationskomplex und den Start von weiteren Transkriptionsrunden zu ermöglichen.

Zur Untersuchung der Serin 2 und 5 Phosphorylierungen der Pol II CTD wurden *Scanning* ChIP-qPCR Experimente (parallel zum Experiment aus Abbildung 25) mit Antikörpern durchgeführt, die spezifisch die jeweiligen Modifikationen in den *Repeats* der CTD erkennen sollen [102]. Wie in den vorherigen Experimenten erfolgte eine Behandlung der Caki-1 Zellen mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264, dem aktivierenden Stimulus TGF β_1 oder einer Kombination.

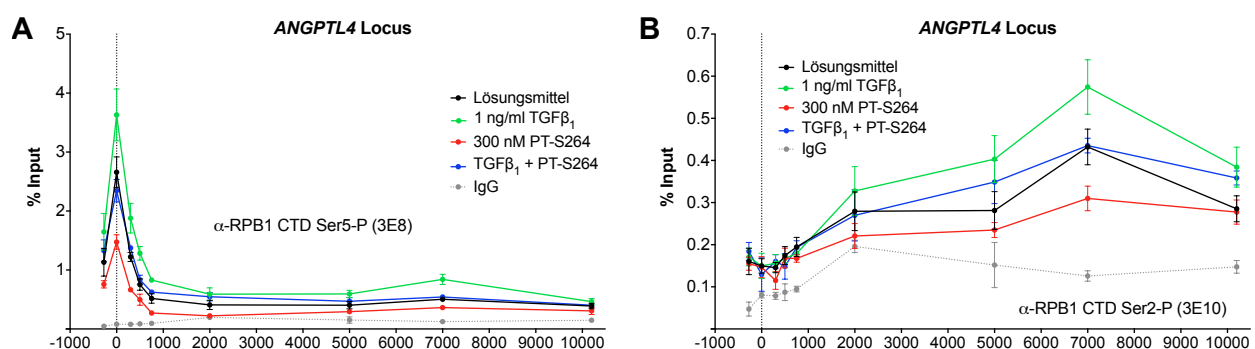


Abbildung 27: *Scanning* ChIP-qPCR, Untersuchung der Phosphorylierung von Serin 2 und 5 der RNA-Polymerase II RPB1 CTD-*Repeats*. Caki-1 Zellen wurden 30 Minuten mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264, TGF β_1 oder beiden Stoffen in Kombination behandelt. Anschließend wurde eine ChIP mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt und wie in Abbildung 25 die Anreicherung an verschiedenen Positionen des *ANGPTL4* Locus gemessen. Repräsentatives Experiment.

In Abbildung 27 ist zu sehen, dass die Detektion der Phosphorylierung an Serin 5 der RPB1 CTD *Repeats* am Transkriptionsstart ihr Maximum aufweist. Über den Genkörper nimmt das Signal ab. Durch die Behandlung mit TGF β_1 kommt es bereits am Transkriptionsstart zum Anstieg der Anreicherung, der sich über das Gen fortsetzt. Werden die Zellen zusätzlich mit PT-S264 behandelt, so wird dieser Anstieg unterdrückt. Somit gleicht das Muster der vier Behandlungen dem zuvor beschriebenen Muster, das mit RPB1 CTD bzw. RPB1 NTD Antikörpern beobachtet wurde (zum Beispiel im parallel durchgeführten ChIP-Experiment in Abbildung 25). Bei der Interpretation der Daten muss allerdings berücksichtigt werden, dass sich in den PT-S264 behandelten Zellen generell weniger RNA-Polymerase II am Transkriptionsstart und im

Genkörper befindet (Kapitel 5.2.2). Das niedrigere Signal nach der Behandlung mit dem inversen Agonisten weist somit nicht unbedingt auf einen Verlust der Serin 5 Phosphorylierung hin. Wenn insgesamt weniger Polymerase am Locus vorhanden ist, würde das Signal des RPB1 Ser5-P Antikörpers auch dann sinken, wenn der Anteil der an Serin 5 phosphorylierten Polymerase relativ zur Gesamtmenge gleich bliebe. Bei der Behandlung mit TGF β_1 würde durch die erhöhte Menge an Polymerase am Locus der gegenteilige Effekt eintreten.

Aufgrund des Zeitpunktes für das Auftreten der RPB1 CTD Serin 2 Phosphorylierung innerhalb des Transkriptionszyklus (Kapitel 1.4.3), ist hier am Transkriptionsstart das Minimum des Signals zu erwarten und ein Anstieg des Signals über den Genkörper. In der ChIP mit dem Antikörper, der spezifisch RPB1 CTD *Repeats* mit einer Phosphorylierung an Serin 2 erkennen soll, wird genau dieses Muster beobachtet (Abbildung 27B). Bei Betrachtung der einzelnen Behandlungen fällt erneut ein erhöhtes Signal in den TGF β_1 behandelten Zellen und eine verminderte Anreicherung bei der Behandlung mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 auf. Auch hier muss die Gesamtmenge der RNA-Polymerase II bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden (Kapitel 5.2.2).

4.2.3 Überprüfung der Rekrutierung genereller Transkriptionsfaktoren

Mittels ChIP-qPCR konnte in Kapitel 4.2.1 gezeigt werden, dass der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 die Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum Transkriptionsstart des Zielgens *ANGPTL4* verringert. Im nächsten Schritt sollte daher geklärt werden, wie der inverse Agonist die Rekrutierung der Polymerase stört. Hierzu wurde zunächst überprüft, ob andere Komponenten des PIC bzw. RIC, insbesondere die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs), weiterhin zur *ANGPTL4* TSS rekrutiert werden. Caki-1 Zellen wurden für 30 Minuten mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264, dem aktivierenden Stimulus TGF β_2 oder beiden Stoffen in Kombination behandelt. Anschließend wurden ChIP-qPCR Experimente mit Antikörpern durchgeführt, die gegen die GTFs TFIIA, TFIIB, TBP und TFIH gerichtet sind. Wie aus Abbildung 28 hervorgeht, führt die Behandlung mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten zu einer verminderten Anreicherung durch den TFIIB-Antikörper bereits am Transkriptionsstart. Der Anstieg der Rekrutierung von TFIIB durch TGF β_2 kann durch die gleichzeitige Gabe von PT-S264 effizient unterdrückt werden. Somit ergibt sich ein Muster, das mit dem Bindungsprofil der RNA-Polymerase II bei den jeweiligen Behandlungen vergleichbar ist. Bei Betrachtung der generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TBP und TFIH fällt auf, dass ihre Anwesenheit am *ANGPTL4* Transkriptionsstart durch die Behandlung mit PT-S264 im Gegensatz zur Rekrutierung von TFIIB nicht verringert wird.

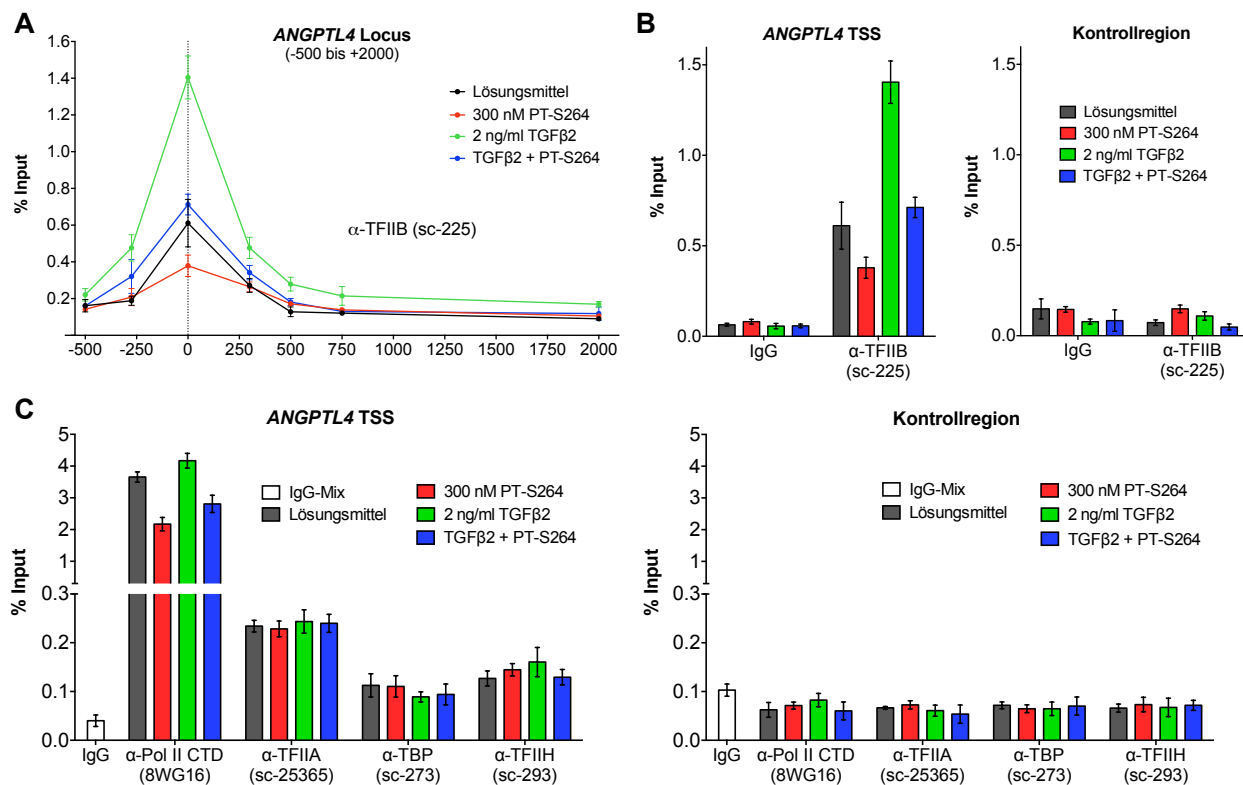


Abbildung 28: ChIP-qPCR, Überprüfung der Rekrutierung von GTFs zum *ANGPTL4* Locus. Nach einer 30-minütigen Behandlung von Caki-1 Zellen mit dem inversen PPARβ/δ Agonisten PT-S264, TGFβ₂ oder beiden Stoffen in Kombination, wurde eine ChIP mit Antikörpern gegen generelle Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II RPB1 CTD durchgeführt. A) ChIP-qPCR mit α-TFIIB, begrenztes *Scanning* des *ANGPTL4* Locus um den Transkriptionsstart herum. B) ChIP-qPCR mit α-TFIIB, *ANGPTL4* TSS und Kontrollregion mit IgG-Kontrolle. C) ChIP-qPCR von generellen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II (RPB1) CTD am *ANGPTL4* TSS und in einer Kontrollregion. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

4.2.4 Überprüfung der Rekrutierung von Mediator-Untereinheiten

Der Mediator-Komplex übernimmt mehrere Funktionen innerhalb des Transkriptionszyklus. Wie in Kapitel 1.5.2 erläutert wurde, erleichtert der Mediator-Komplex die Rekrutierung von TFIIB zum Transkriptionsstart. Sowohl der Mediator-Komplex als auch TFIIB werden in einem rekonstituierten humanen Transkriptionssystem^[18] und in *S. cerevisiae* *in vivo* für die Bindung der RNA-Polymerase II benötigt^[76]. Daher sollte überprüft werden, ob durch den inversen PPARβ/δ Agonisten PT-S264 bereits die Rekrutierung des Mediators gestört wird. Es wurden ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen die Mediator-Untereinheiten MED1, MED26 und MED13L durchgeführt. Die Behandlung der Caki-1 Zellen erfolgte wie im vorherigen Kapitel. Aus Abbildung 29 wird ersichtlich, dass bei der Behandlung mit TGFβ₂ für alle drei untersuchten Untereinheiten eine erhöhte Anreicherung um den *ANGPTL4* Transkriptionsstart messbar ist.

Diese verstärkte Rekrutierung kann durch die gleichzeitige Gabe des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 verhindert werden. Aufgrund der niedrigen Anreicherung der MED1 und MED26 Antikörper, liegen die Lösungsmittel-Kontrolle und die PT-S264 Probe im Bereich der Detektionsgrenze, sodass hier keine Aussage über eine reduzierte Rekrutierung getroffen werden kann. Abbildung 29E zeigt einen Vergleich der Anreicherung mit dem MED13L Antikörper und mit einem RNA-Polymerase II (RPB1) CTD Antikörper am *ANGPTL4* TSS im selben Experiment. Es wird deutlich, dass die MED13L Rekrutierung dem gleichen Muster folgt wie die Rekrutierung der Polymerase.

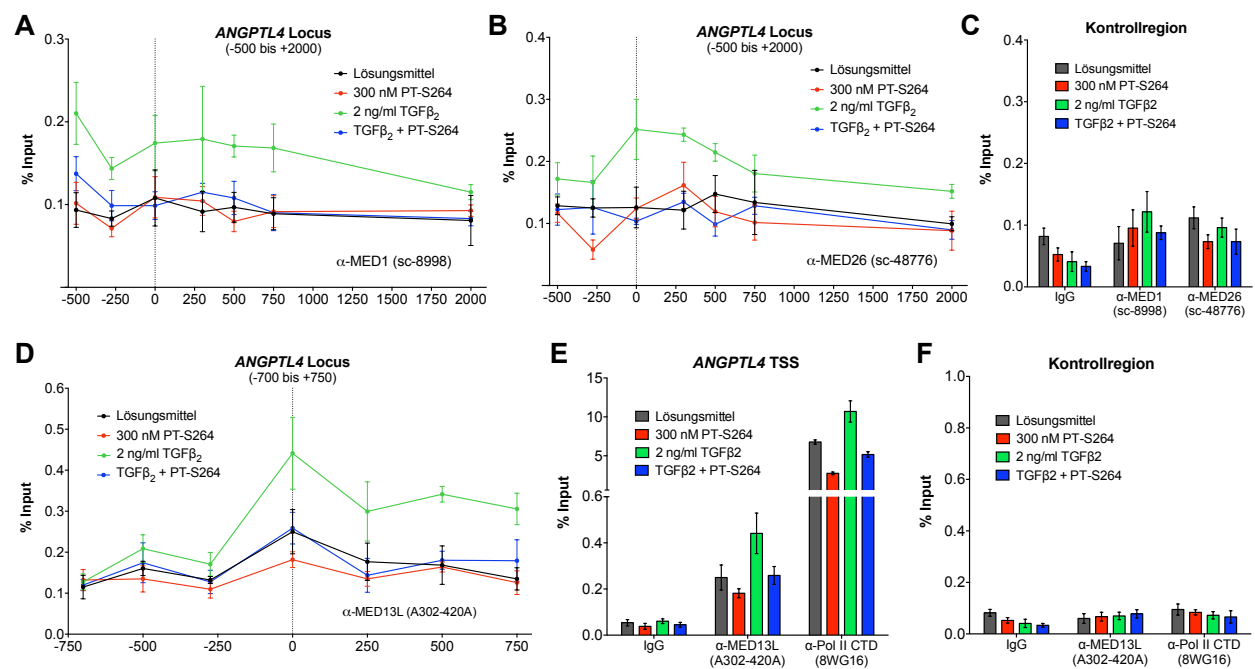


Abbildung 29: ChIP-qPCR, Überprüfung der Rekrutierung von Mediator-Untereinheiten zum *ANGPTL4* Locus. Caki-1 Zellen wurden 30 Minuten mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264, TGF β_2 oder beiden Stoffen in Kombination behandelt. Anschließend wurden ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen die Mediator-Untereinheiten MED1 und MED26 durchgeführt (A-C). In einem weiteren Experiment wurde ein Antikörper gegen die Untereinheit MED13L des Kinase-Moduls des Mediator-Komplexes und ein Antikörper gegen die RNA-Polymerase II (RPB1) CTD eingesetzt. Mittels *Scanning* ChIP-qPCR bzw. ChIP-qPCR wurde die Anreicherung mehrerer Bereiche um den *ANGPTL4* Transkriptionsstart (D) bzw. des *ANGPTL4* TSS (E) und einer Kontrollregion (F) gemessen. Die Daten zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment.

4.3 Identifizierung beteiligter Co-Repressoren

RNA-Interferenz (RNAi) basierte Experimente unserer Arbeitsgruppe (Anhang Abb. Z2) zeigten, dass die Depletion von NCoR1 einzeln sowie in Kombination mit einer Depletion von NCoR2 und SHARP, die basale Repression durch PPAR β/δ in gleichem Maße verringert wie eine Depletion von PPAR β/δ [8]. Die verstärkte Repression durch den in diesen Experimenten verwendeten inversen Agonisten ST247 konnte hingegen nicht durch die Depletion der kanonischen Co-Repressoren unterbunden werden. Der *Knockdown* von *PPARD* diente als Kontrolle und führte erwartungsgemäß zum Verlust der Repression durch den inversen Agonisten. Weiterhin zeigte sich zwar die basale Repression sensitiv gegenüber einer Inhibition von HDACs durch Trichostatin A (TSA), die Repression durch den inversen Agonisten blieb jedoch unbeeinträchtigt. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die transkriptionelle Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten unabhängig von NCoR/SMRT-HDAC Komplexen ist und sich mechanistisch von der basalen Repression durch den unligierten Rezeptor unterscheidet. Somit könnten unbekannte Co-Repressoren involviert sein, deren Identifizierung für die Aufklärung des Mechanismus von großer Bedeutung ist. Es ist jedoch anzumerken, dass eine lediglich partielle RNA-Interferenz vermittelte Depletion der Co-Repressoren unter Umständen nicht ausreicht, um einen vollen Funktionsverlust herbeizuführen.

4.3.1 Interaktom-Analysen mittels RIME (ChIP-MS)

Um potentiell am Mechanismus beteiligte Co-Repressoren zu identifizieren, wurde ein unvoreingenommener Ansatz in Form des RIME-Protokolls der Firma Active Motif gewählt (Kapitel 3.3.3). Mittels ChIP-MS basierten Interaktom-Analysen sollten Faktoren abgegrenzt werden, mit denen PPAR β/δ spezifisch bei Bindung eines inversen Agonisten, jedoch nicht in Anwesenheit eines Agonisten, interagiert. Hierfür wurde die Zelllinie MDA-MB231-*luc2* verwendet, da diese eine besonders starke Repression von PPAR β/δ -Zielgenen durch inverse Agonisten zeigt (Kapitel 4.1).

Die Zellen wurden zunächst für 30 Minuten mit 300 nM PT-S264 (inverser Agonist) oder 1 μ M des PPAR β/δ Agonisten L165,041 behandelt. Anschließend erfolgte die Fixierung wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Die Immunpräzipitation des Zielproteins PPAR β/δ (Antikörper sc-7197) nach dem RIME-Protokoll sowie die massenspektrometrische Analyse der präzipitierten Proteine wurde von der Firma *Active Motif Epigenetic Services* durchgeführt. Als Negativkontrolle erfolgte parallel eine Immunpräzipitation mit einer IgG-Fraktion eines nicht-immunisierten Kaninchens.

Protein oder Cluster	Gen(e)	IgG PT-S264	α -PPAR β/δ PT-S264	α -PPAR β/δ L165,041	Diff.
Neuropathy target esterase	<i>PNPLA6</i>	0	36	41	-5
Envoplakin	<i>EVPL</i>	0	32	24	8
Periplakin	<i>PPL</i>	0	20,5	10,5	10
Cytospin-A	<i>SPECC1L</i>	0,5	16	22,5	-6,5
Nuclear receptor corepressor 2	<i>NCOR1, NCOR2</i>	0	14,5	0	14,5
Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	<i>PPA2</i>	0	14,5	14	0,5
Kinesin-like protein KIF15	<i>KIF15</i>	0,5	11	5,5	5,5
Peroxisome proliferator-activated receptor δ	<i>PPARD</i>	0	10	16	-6
2-hydroxyacyl-CoA lyase 1	<i>HACL1</i>	0	10	12	-2
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	<i>ITPR2</i>	0	9,5	5	4,5
BAG family molecular chaperone regulator 3	<i>BAG3</i>	0	8,5	6,5	2
Retinoid X receptor RXR-β	<i>RXRB, RXRA</i>	0	8	14,5	-6,5
Myotubularin-related protein 12	<i>MTMR12</i>	0	8	5,5	2,5
Zinc finger protein ZPR1	<i>ZPR1</i>	0	7	7	0
TBC1 domain family member 2A	<i>TBC1D2</i>	0,5	6	4	2
Melanoma inhibitory activity protein	<i>MIA3</i>	0	5,5	2	3,5
Nuclear distribution protein nudE-like 1	<i>NDEL1, NDE1</i>	0	5,5	4	1,5
GTPase-activ. prot. and VPS9 domain-cont. 1	<i>GAPVD1</i>	0	5,5	2	3,5
Zinc finger and BTB domain-containing 9	<i>ZBTB9</i>	0,5	4,5	3,5	1
Membrane-assoc. progesterone rec. comp. 2	<i>PGRMC2</i>	0	4	2	2
Protein kinase Cd -binding protein	<i>PRKCDBP</i>	1	4	3,5	0,5
Complement C4-A	<i>C4A</i>	0	3,5	3,5	0
Non-specific lipid-transfer protein	<i>SCP2</i>	1	3	0	3
Ig γ -2 chain C region	<i>IGHG2</i>	2	3	1	2
5'-3' exoribonuclease 1	<i>XRN1</i>	0	2,5	5	-2,5
MIA SH3 domain ER export factor 2	<i>MIA2/CTAGE5</i>	0	2,5	0	2,5
m7GpppX diphosphatase	<i>DCPS</i>	0	2,5	3,5	-1
EF-hand calcium-bind. domain-cont. prot. 4A	<i>CRACR2B</i>	0	2,5	2,5	0
Complement C3	<i>C3</i>	0	2	0	2
FGFR1 oncogene partner	<i>FGFR1OP</i>	0	2	0,5	1,5
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM4	<i>TRIM4</i>	1	2	1	1
3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	<i>ACAA1</i>	0	1,5	0,5	1
Transducin-β like 1 X-linked receptor 1	<i>TBL1XR1</i>	0	1,5	0	1,5
Importin subunit α -1	<i>KPNA2</i>	1	1,5	0,5	1
Eukaryotic translation initiation factor 5	<i>EIF5</i>	1,5	1	0	1
E3 ubiquitin-protein ligase RFW2	<i>RFWD2</i>	0	0	2	-2

Tabelle 27: RIME ChIP-MS Analyse, PPAR β/δ -Interaktoren in Anwesenheit von PT-S264 bzw. L165,041

Spalte 3-5 zeigt den Mittelwert der eindeutig identifizierten Peptide aus je zwei technischen Replikaten; die letzte Spalte gibt die Differenz der Peptid-Anzahl zwischen PT-S264 und L165,041 an.

Als Negativkontrolle diente eine IgG-Fraktion eines nicht-immunisierten Kaninchens.

Das Antikörper-Ziel (*PPARD*) und bekannte Interaktoren sind fett gedruckt.

Die Liste der massenspektrometrisch detektierten Proteine wurde mit Hilfe der Software Scaffold Viewer 4.8.3 nach stringenten Kriterien gefiltert: mindestens zwei eindeutige Peptide in einem Replikat der PPAR β/δ -Immunpräzipitation und maximal zwei eindeutige Peptide in der unspezifischen Immunpräzipitation (IgG-Negativkontrolle). Um ausschließlich Kandidaten mit hoher Konfidenz zu betrachten, wurden die Peptid- und Protein-Grenzwerte jeweils auf 80 % festgelegt. Tabelle 27 auf der vorherigen Seite zeigt die Ergebnisse der ChIP-massenspektrometrischen Analysen nach Anwendung der beschriebenen Filterkriterien. Aufgelistet sind die detektierten putativen Interaktoren von PPAR β/δ und der Mittelwert der eindeutig identifizierten Peptide (aus je zwei technischen Replikaten) in den jeweiligen Immunpräzipitationen. Die letzte Spalte gibt die Differenz der Peptid-Anzahl zwischen den PT-S264 und L165,041 behandelten Proben wieder. Die Gennamen des Antikörper-Ziels (*PPARD*) und bekannter Interaktoren von PPAR β/δ sind hervorgehoben.

Erwartungsgemäß konnten PPAR β/δ und sein Heterodimerisierungspartner RXR sowohl in Anwesenheit des inversen Agonisten PT-S264 als auch in Anwesenheit des Agonisten L165,041 detektiert werden. Die Co-Repressoren NCoR (Genname *NCOR1*) und SMRT (Genname *NCOR2*) konnten ausschließlich in Anwesenheit des inversen Agonisten und nicht in Anwesenheit des Agonisten als Interaktoren identifiziert werden. Beide sind in der Ergebnistabelle dem NCOR2 Protein-Cluster zugeordnet. Bei einer genaueren Aufschlüsselung dieses Clusters ergeben sich in den beiden PT-S264 behandelten Replikaten 15 bzw. 7 Peptide für NCoR und lediglich 4 bzw. 3 Peptide für SMRT. Mit TBL1XR1 konnte eine weitere Untereinheit der NCoR/SMRT-Komplexe ausschließlich bei Bindung des inversen Agonisten detektiert werden. Die Liste enthält darüber hinaus keine anderen bekannten transkriptionellen Co-Repressoren. Weiterhin fällt bei Betrachtung der L165,041 behandelten Proben überraschenderweise auf, dass außerdem keine der für Kernrezeptoren bekannten Co-Aktivatoren detektiert wurden.

4.3.2 Validierung der Rekrutierung von NCoR/SMRT-Komplexen

Die spezifische Rekrutierung von Untereinheiten der NCoR/SMRT-Komplexe in Anwesenheit eines inversen PPAR β/δ Agonisten sollte mittels ChIP-qPCR validiert werden. In den ChIP-MS Analysen konnte aus den in Kapitel 5.3.1 erläuterten Gründen keine unbehandelte Probe betrachtet werden. Daher sollte in den nachfolgenden Experimenten insbesondere geklärt werden, ob es durch die Bindung des inversen Agonisten an PPAR β/δ zu einer verstärkten Rekrutierung der Co-Repressoren im Vergleich zum unligierten Rezeptor kommt.

Zunächst wurden ChIP-qPCR Experimente mit zwei verschiedenen NCoR-Antikörpern durchgeführt, da für diesen Co-Repressor in den massenspektrometrischen Analysen die meisten Peptide detektiert wurden. Die MDA-MB231-*luc2* Zellen wurden 30 Minuten mit 300 nM PT-

S264, 1 ng/ml TGF β ₁ oder beiden Stoffen in Kombination behandelt. Mittels ChIP-qPCR wurde die DNA-Anreicherung der PPRES der PPAR β/δ Zielgene *ANGPTL4* und *PDK4* gemessen. Wie Abbildung 30A zeigt, ist NCoR bereits im Basalzustand an den *ANGPTL4* und *PDK4* PPRES anwesend. Die Behandlung mit dem inversen Agonisten PT-S264 führt zu einer verstärkten Rekrutierung von NCoR sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von TGF β ₁. Die beiden verwendeten Antikörper reichern zwar allgemein unterschiedlich stark an, es ergibt sich aber dennoch ein sehr ähnliches Muster der NCoR-Rekrutierung. In Caki-1 Zellen kann unter gleichen Bedingungen ebenfalls eine verstärkte Rekrutierung von NCoR in Anwesenheit des inversen Agonisten detektiert werden (Abbildung 30B).

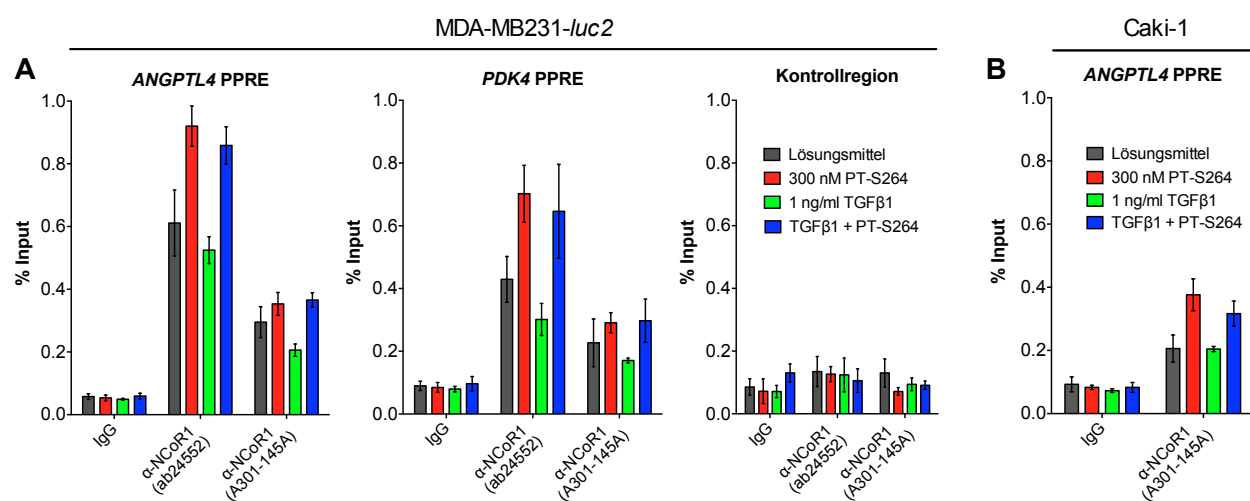


Abbildung 30: ChIP-qPCR, Rekrutierung von NCoR an die *ANGPTL4* und *PDK4* PPRES in Anwesenheit des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264. MDA-MB231-luc2 (A) oder Caki-1 (B) Zellen wurden 30 Minuten mit den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264, TGF β ₁ oder beiden Stoffen behandelt. Anschließend wurde eine ChIP mit NCoR1-Antikörpern durchgeführt und die Anreicherung der *ANGPTL4* und *PDK4* PPRES mittels qPCR gemessen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

In einem weiteren ChIP-qPCR Experiment wurde die Rekrutierung der NCoR/SMRT-Komplex Untereinheiten NCoR, SMRT, TBLR1 und HDAC3 untersucht. Die Behandlung der MDA-MB231-luc2 Zellen erfolgte äquivalent zur Behandlung in den RIME (ChIP-MS) Experimenten mit 300 nM PT-S264 bzw. 1 μ M L165,041 oder mit dem Lösungsmittel DMSO. Aus den Daten in Abbildung 31 wird ersichtlich, dass die Komplex-Komponenten NCoR, SMRT, HDAC3 und TBLR1 bereits im Basalzustand an den *ANGPTL4* und *PDK4* PPRES anwesend sind. Für NCoR, SMRT und HDAC3 ist eine verstärkte Rekrutierung bei der Behandlung mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten zu verzeichnen. Der TBLR1 Antikörper reichert relativ schwach an und es wird aus den Daten keine verstärkte Rekrutierung ersichtlich. In Anwesenheit des PPAR β/δ Agonisten L165,041 sinkt das Signal für alle betrachteten Untereinheiten der NCoR/SMRT-Komplexe deutlich unter das Basalniveau.

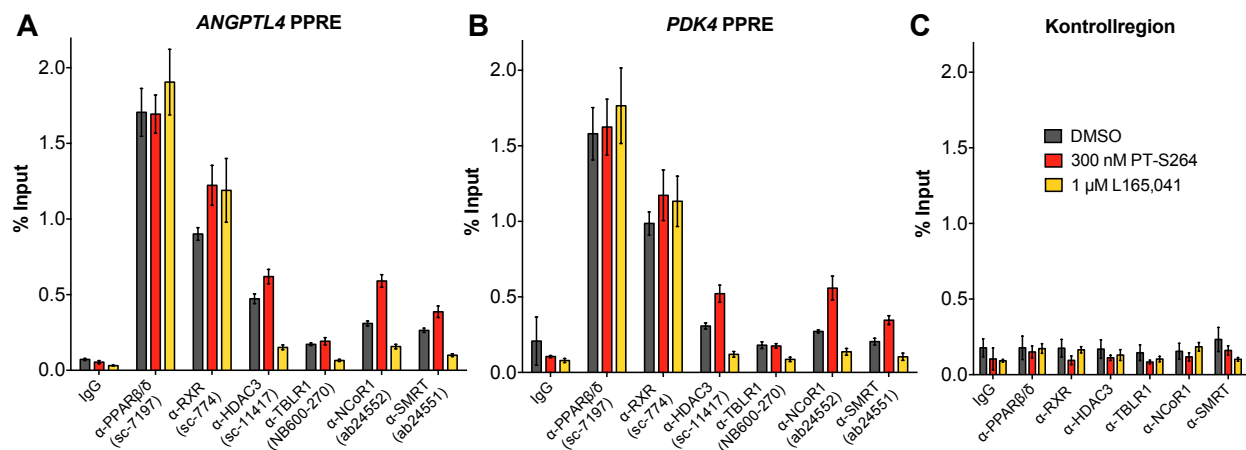


Abbildung 31: ChIP-qPCR, Rekrutierung von Untereinheiten der NCoR/SMRT-Komplexe in Anwesenheit des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264. Nach der 30-minütigen Behandlung von MDA-MB231-*luc2* Zellen mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 bzw. dem Agonisten L165,041 wurden ChIPs mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Mittels qPCR wurde die Anreicherung der *ANGPTL4* und *PDK4* PPRES gemessen. Die Daten zeigen ein repräsentatives Experiment.

4.4 Charakterisierung des *PPARD* KO Klons und Rekonstitution

4.4.1 Charakterisierung des MDA-MB231-*luc2* *PPARD* KO Klons 2B3

Wie bereits in Kapitel 1.6.2 angesprochen, konnte in der eigenen Masterarbeit ^[155] mittels CRISPR/Cas9 ein *Knockout* von *PPARD* in der Zelllinie MDA-MB231-*luc2* generiert werden. Von 40 getesteten Klonen zeigten vier Klone einen *Knockout* von *PPARD*, der auf Proteinebene in einem Western Blot und durch ChIP-Experimente bestätigt werden konnte. Weiterhin zeigten diese vier Klone einen Verlust der Responsivität der *ANGPTL4* Transkription gegenüber PPAR β/δ Liganden. Drei der Klone erwiesen sich während der weiteren Charakterisierung als ungeeignet für die geplanten Experimente. Der Klon 2A6 wies starke Wachstums- und Viabilitätsdefizite auf. In Klon 2B2 kam es zu einer Integration der Cas9 cDNA, was zu einer dauerhaften Expression der Nuklease führte. Klon 2A3 konnte aufgrund der Integration des transient transfizierten Blasticidin-Resistenzgens nicht für einen funktionellen Screen mit den im pMSCV-bsd-Vektor vorliegenden cDNAs der *PPARD*-Mutanten eingesetzt werden.

Der verbleibende Klon 2B3 zeigte gutes Wachstum und wies keine Expression der Cas9 Nuklease oder des Blasticidin-Resistenzgens auf. Im Verlauf der Masterarbeit konnte dieser Klon bereits erfolgreich durch retrovirale Infektion mit dem Vektor pMSCVbsd-PPARD rekonstituiert werden. Da der MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Klon in der vorliegenden Arbeit in zahlreichen Experimenten verwendet wird, werden in diesem Kapitel kurz die Experimente der Masterarbeit zur Validierung und Charakterisierung des Klons zusammengefasst (Abbildung 32).

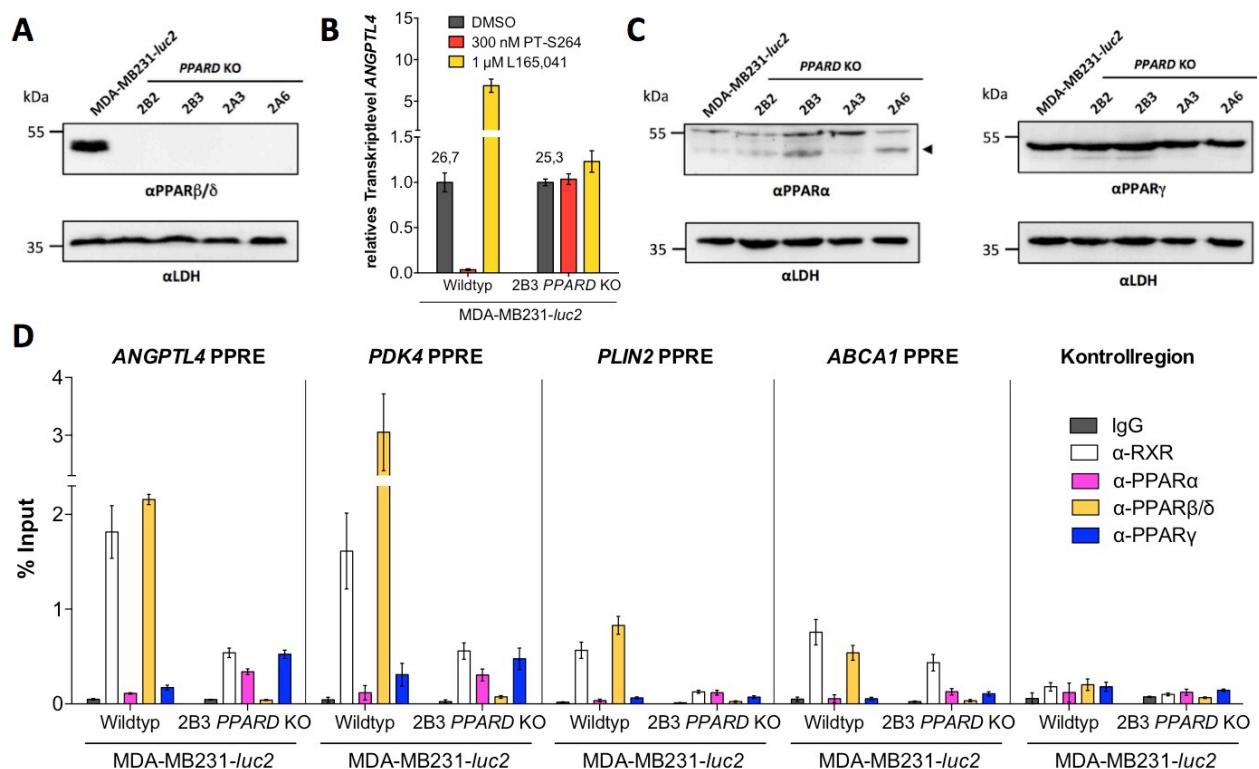


Abbildung 32: Charakterisierung des MDA-MB231-luc2 2B3 *PPARD* KO Klon. A) Validierung des *PPARD* KO auf Proteinebene mittels PPARβ/δ Western Blot. B) Nachweis des Verlusts der Responsivität der *ANGPTL4* Transkription zu PPARβ/δ-Liganden. C) Überprüfung der Proteinlevel von PPARα und PPARγ mittels Western Blot. D) Validierung des *PPARD* KO auf Proteinebene mittels ChIP-qPCR unter Betrachtung der PPRES verschiedener PPARβ/δ-Zielgene. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

Wie aus Abbildung 32A hervorgeht, ist im PPARβ/δ Western Blot in keinem der vier potentiellen MDA-MB231-luc2 *PPARD* KO Klone eine verbliebene Expression von PPARβ/δ auf Proteinebene nachzuweisen. Der MDA-MB231-luc2 *PPARD* KO Klon 2B3 zeigt einen Verlust der PPARβ/δ-Ligandenresponsivität der *ANGPTL4* Transkription (Abbildung 32B). Mittels Western Blot kann weiterhin eine Expression von PPARα und PPARγ auf Proteinebene detektiert werden (Abbildung 32C). In ChIP-qPCR Experimenten ist beim *PPARD* KO Klon 2B3 der Verlust von PPARβ/δ auf Ebene der DNA-Bindung an den PPRES verschiedener PPARβ/δ-Zielgene ersichtlich (Abbildung 32D). Die RXR-Bindung an den PPRES geht ebenfalls deutlich zurück. Im *PPARD* KO Klon 2B3 kommt es durch den Verlust von PPARβ/δ zu einer erhöhten Bindung von PPARα und PPARγ an den PPRES der untersuchten Zielgene.

4.4.2 Sequenzierung des MDA-MB231-*luc2* *PPARD* KO Klons 2B3

In vielen Tumoren kommt es im Verlauf zur Anhäufung von Mutationen im Genom oder es tritt eine allgemeine genomische Instabilität auf. Es kann zu numerischen (z. B. durch den Verlust oder die Vervielfältigung von Chromosomen) oder strukturellen (z. B. durch Translokationen) Chromosomenaberrationen kommen. Diese Prozesse können dazu führen, dass die Anzahl von Allelen eines Gens von der in gesunden Zellen üblichen Anzahl abweicht. Bevor der CRISPR/Cas9 vermittelte *Knockout* von *PPAR* β/δ in der Brustkrebszelllinie MDA-MB231-*luc2* angestrebt wurde, erfolgte daher eine Überprüfung der Zelllinie auf die Anzahl der vorliegenden Allele des *PPARD* Gens. Von Frau Dr. Barbara Fritz durchgeführte Analysen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ergaben, dass die Zelllinie MDA-MB231-*luc2* je nach betrachteter Zelle zwei bis drei Allele des *PPARD* Gens besitzt.

Im Laufe dieser Doktorarbeit sollte genauer charakterisiert werden, welche Veränderungen an den *PPARD* Allelen des MDA-MB231-*luc2* *PPARD* KO Klons 2B3 durch die Anwendung der CRISPR/Cas9-Methode entstanden sind. Dazu wurde die genomische DNA aus den Zellen isoliert und die Bindungsbereiche der verwendeten guideRNAs mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe des *TOPO TA Cloning Kits* von *Invitrogen* in einen Vektor eingebracht. Nach der Transformation in *E. coli* Bakterien wurden mehrere Kolonien von der LB/Agar-Ampicillin Platte gepickt, Mini-Plasmidpräparationen durchgeführt und die Plasmide zur Sequenzierung eingeschickt.

Wie Abbildung 33 zu entnehmen ist, kommt es in sechs von sechs sequenzierten Plasmid-Klonen im Bereich der Erkennungssequenz von gRNA1 (TCGTACGATCCGCATGAAGC) innerhalb von Exon 6 des *PPARD* Gens zur Deletion eines Adenins. Keiner der vier sequenzierten Klone zeigt im Bindungsbereich von gRNA2 (CCCTGTGCAGCTATCCGTTT) eine Veränderung im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Im Bereich der Erkennungssequenz von gRNA3 (AACACTCACC GCCGTGTGGC) am Ende von Exon 7 kommt es in vier von acht Klonen zur Insertion eines Adenins.

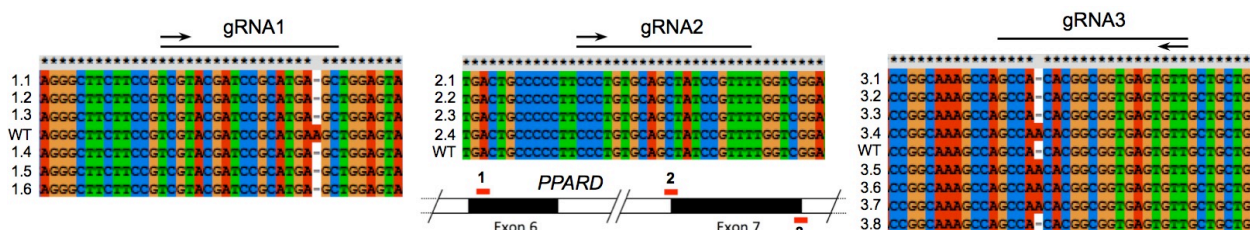


Abbildung 33: Sequenzierung des MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Klons in den Bereichen der Erkennungssequenzen der gRNAs. Links: Im Bereich der Erkennungssequenz von gRNA1 kommt es in 6/6 Klonen zur Deletion eines Adenins. Mitte (oben): Keiner der vier Klone zeigt eine Veränderung im Bereich der Erkennungssequenz von gRNA2. Mitte (unten): schematischer Überblick über die Lage der Bindungsstellen der gRNAs innerhalb des *PPARD* Gens. Rechts: Im Bereich der Erkennungssequenz von gRNA3 kommt es in 4/8 Klonen zur Insertion eines Adenins. Sequenzen dargestellt mit Clustal X.

4.4.3 Rekonstitution des MDA-MB231-*luc2* *PPARD* KO Klons 2B3

Die ektopische Expression von PPAR β/δ unter der Kontrolle des starken Cytomegalovirus (CMV) Promotors führte in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe zur Bildung intrazellulärer Aggregate, sodass die Ligandenfunktion nicht wiederhergestellt werden konnte. Für die Durchführung des funktionellen Screens von PPAR β/δ Mutanten sollte daher ein Expressionssystem zum Einsatz kommen, das niedrigere Expressionslevel ermöglicht.

Bevor der funktionelle Screen von PPAR β/δ Mutanten gestartet wurde, sollte überprüft werden, ob mit dem gewählten System eine erfolgreiche Rekonstitution des MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Klons erzielt werden kann. Im Vorfeld der retroviralen Infektion mit dem Vektor pMSCVbsd-*PPARD* wurden die zu infizierenden 2B3 Zellen stabil mit einem Expressionskonstrukt für den murinen ecotropen Rezeptor Slc7a1 transfiziert (Vektor pWZLneo-ecoR) ^[155]. Dieser wird in menschlichen Zellen nicht exprimiert, wodurch mit dem gewählten retroviralen Expressionssystem ein Arbeiten unter nicht-humanpathogenen Bedingungen (Sicherheitsstufe 1) möglich ist. Der Selektionsdruck wurde durch 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 im Medium kontinuierlich bis zur Infektion aufrecht erhalten. Die Produktion der Virusüberstände in Phoenix-eco Zellen und die retrovirale Infektion der 2B3-ecoR Zellen erfolgte wie in den Kapiteln 3.5.3 und 3.5.4 beschrieben. Die Expression von PPAR β/δ durch den pMSCV Vektor wird von den vergleichsweise schwachen viralen LTRs (*long terminal repeats*) getrieben und erlaubt somit niedrigere Expressionslevel als etwa ein CMV-Promotor getriebenes System. Nach ca. 14 Tagen in Selektion (mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidin) wurde mittels Western Blot die Expression von PPAR β/δ auf Proteinebene überprüft. Außerdem wurden die Zellen mit PPAR β/δ -Liganden und TGF β_1 behandelt und eine RT-qPCR durchgeführt, um den Erfolg der Rekonstitution auf funktioneller Ebene zu testen.

Wie aus Abbildung 34A auf der nächsten Seite hervorgeht, kann die Expression von PPAR β/δ auf Proteinebene nach der Infektion der 2B3 *PPARD* KO Zellen mit pMSCVbsd-*PPARD* Virusüberständen im Western Blot detektiert werden. Es fällt jedoch auf, dass die ektopische Expression trotz des schwächeren Expressionssystems weiterhin deutlich über dem endogenen PPAR β/δ -Level in MDA-MB231-*luc2* Zellen liegt. Die Ergebnisse der RT-qPCR in Abbildung 34B zeigen, dass durch die pMSCV-getriebene Expression von PPAR β/δ in den 2B3 *PPARD* KO Zellen das basale Transkriptlevel von *ANGPTL4* sinkt (Ct 26,3 gegenüber Ct 28,9) und ungefähr das in MDA-MB231-*luc2* Wildtyp Zellen beobachtete Niveau (Ct 29,2) erreicht wird. Sowohl die Aktivierung durch den PPAR β/δ Agonisten L165,041 als auch die Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 konnten wiederhergestellt werden. Jedoch fällt der Repressionsfaktor im Vergleich zu Wildtyp-Zellen von 15x auf 5x und der Aktivierungsfaktor steigt von 11x auf 20x.

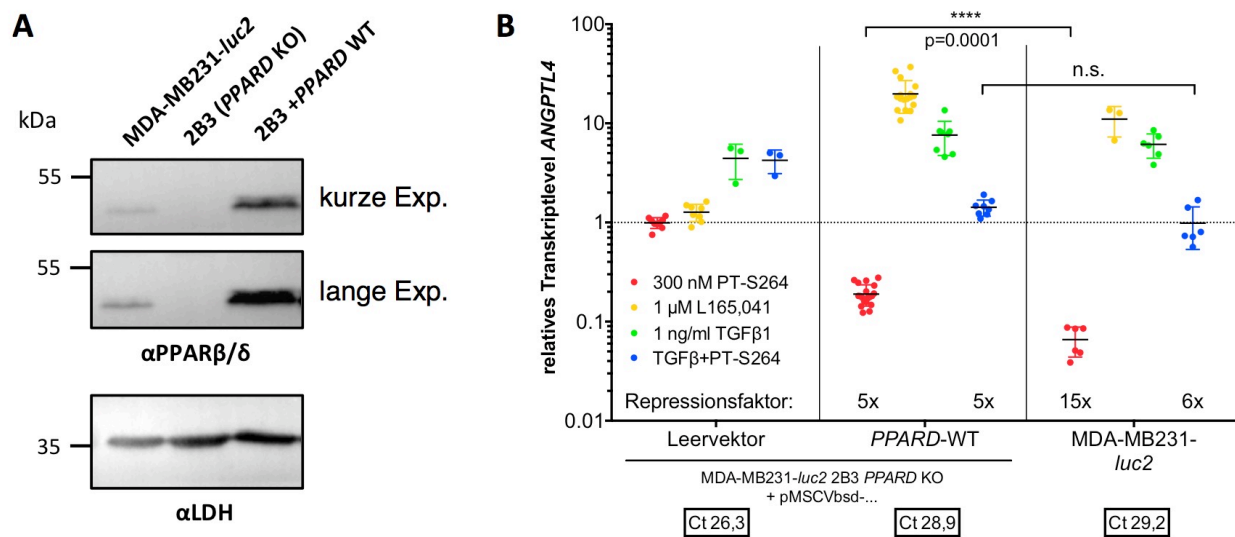


Abbildung 34: Rekonstitution des MDA-MB231-luc2 2B3 PPARD KO Klon. Der MDA-MB231-luc2 2B3 Klon wurde stabil mit dem ecotropen Rezeptor Slc7a1 transfiziert und anschließend mit Virusüberständen aus Phoenix-eco Zellen retroviral infiziert (Vektor pMSCVbsd-PPARD). A) Western Blot zur Überprüfung der Expression von PPARβ/δ auf Proteinebene. Oben: kurze Exposition, Unten: lange Exposition. B) RT-qPCR zur Überprüfung der erfolgreichen Rekonstitution der MDA-MB231-luc2 2B3 PPARD KO Zellen und der Wiederherstellung der PPARβ/δ-Ligandenresponsivität auf funktioneller Ebene. Es wurden je 2×10^5 Zellen auf 6-wells ausgesät und am nächsten Tag für sechs Stunden mit den angegebenen Substanzen behandelt. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und das relative Transkriptlevel von *ANGPTL4* (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle) mittels RT-qPCR gemessen. Unterhalb der Namen der Zelllinien ist der normalisierte basale Ct-Wert der Lösungsmittelkontrollen angegeben. Jeder Datenpunkt zeigt ein biologisches Replikat, jeweils errechnet aus drei technischen Replikaten. n.s. = nicht signifikant, **** $p \leq 0,0001$ signifikanter Unterschied (t-Test) der Repressionsfaktoren (PT-S264 vs Lösungsmittel) zwischen 2B3 WT rekonstituiert und MDA-MB231-luc2.

4.5 Funktioneller Screen von PPAR β/δ Mutanten

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wiesen frühere Experimente der Arbeitsgruppe darauf hin, dass ein unbekannter Co-Repressor am Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten beteiligt sein könnte. Ein zentrales Ziel des Projektes war es daher, neue Erkenntnisse über die für die Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten erforderlichen Interaktionsoberflächen des Kernrezeptors zu gewinnen. Um diese Fragestellung zu adressieren, sollte ein funktioneller Screen von PPAR β/δ Mutanten durchgeführt werden. Bislang konnte leider keine Kristallstruktur der PPAR β/δ -LBD bei Bindung des inversen Agonisten PT-S264 generiert werden (Projektteil Iris Nee ^[203], seit Anfang 2019 weitergeführt von Phil Hochban). Der Bindungsmodus des Liganden sowie die induzierte Konformationsänderung des Kernrezeptors sind daher bisher noch ungeklärt. Anhand der Ergebnisse des funktionellen Screens von PPAR β/δ Mutanten könnten sich auch diesbezüglich neue Hinweise ergeben.

4.5.1 Experimentelles Vorgehen und die Messgröße log₂ (Ratio)

Die Herangehensweise stützt sich in diesem Teil des Projektes auf die retrovirale Rekonstitution von *PPARD* KO Zellen mit mutierten PPAR β/δ Konstrukten. In einem funktionellen Screen sollen die so generierten Mutanten auf eine Beeinträchtigung der transkriptionellen Regulation durch PPAR β/δ untersucht werden. Als Modell-Gen dient das besonders stark durch Liganden regulierte Zielgen *ANGPTL4*, dessen Transkriptlevel nach einer Behandlung mit den PPAR β/δ -Liganden PT-S264 und L165,041 mittels RT-qPCR gemessen wird. Dabei werden die drei Regulationstypen basale Repression (anhand des basalen Transkriptlevels), Aktivierung durch einen Agonisten (bei Behandlung mit L165,041) und verstärkte Repression durch einen inversen Agonisten (bei Behandlung mit PT-S264) betrachtet.

In Kapitel 4.4.3 wurde bereits gezeigt, dass der MDA-MB231-*luc2* *PPARD* KO Klon 2B3 erfolgreich durch eine retrovirale Transduktion mit pMSCVbsd-*PPARD*-abgeleiteten Virusüberständen rekonstituiert werden kann. In Vorarbeiten der AG Müller (T. Adhikary, C. Bretscher, B. Wilke, S. Zielke) wurden mittels PCR-Mutagenese (*Site-directed Mutagenesis*) (Kapitel 3.1.4) bereits zahlreiche pMSCVbsd-*PPARD* Mutanten generiert. Weitere Mutanten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit selbst hergestellt (Plasmidaufklüfung in Kapitel 2.4.3). Da davon auszugehen ist, dass ein eventuell unbekannter Co-Repressor im Bereich der LBD mit dem Kernrezeptor interagiert und da diese Domäne auch die Ligandenbindungstasche enthält, handelt es sich beim überwiegenden Teil der eingefügten Mutationen um Punktmutationen von Aminosäuren der LBD.

Die stabil den murinen ecotropen Rezeptor *Slc7a1* exprimierenden MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen wurden mit den in der Verpackungszelllinie Phoenix-eco hergestellten Virus-überständen infiziert (Kapitel 3.5.3, 3.5.4). Der Selektionsdruck wurde dauerhaft durch 10 µg/ml Blasticidin im Medium aufrechterhalten. Aufgrund des bereits in der Masterarbeit ^[155] beobachteten Driftens der infizierten Zellen in späteren Passagen (Kapitel 5.5.1), wurden die Zellen stets zwischen Passage zwei und fünf für die Behandlung ausgesät. Eine längere Kultivierung der Zellen erfolgte nur, wenn dies zwingend erforderlich war, um genügend Zellen für ChIP-Experimente zu erhalten. Die Zellen (2×10^5 pro 6-*well*) wurden für sechs Stunden mit 300 nM des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 oder 1 µM des PPAR β/δ Agonisten L165,041 behandelt. Als Referenz für den Effekt der Liganden und zur Einschätzung der Auswirkungen auf die basale Repression, erfolgte eine Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO. Nach der Isolation der RNA wurde diese revers transkribiert und für eine RT-qPCR eingesetzt. Die relativen Transkriptlevel wurden wie bisher nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode mit dem *RPL27* Ct als *Normalizer* und den DMSO-Proben als Referenz berechnet.

Zur Einschätzung einer Beeinträchtigung der basalen Repression wurde die Differenz der normalisierten basalen Ct-Werte der jeweiligen Mutante und des Wildtyps herangezogen:

$$(1) \quad \text{Ct-Differenz vs. Wildtyp} = \text{basaler Ct (Mutante)} - \text{basaler Ct (Wildtyp)}$$

Um den Einfluss der einzelnen Mutationen auf die Ligandenresponsivität besser beurteilen zu können, ist es erforderlich den Effekt der jeweiligen Behandlung mit dem beim PPAR β/δ Wildtyp erzielbaren Effekt in Relation zu setzen. Zur Vereinfachung dieser Beurteilung wurde eine Messgröße definiert, die ein direktes Ablesen der Beeinträchtigung der Ligandenresponsivität durch die jeweilige Mutation ermöglicht. Diese Messgröße \log_2 (Ratio) nimmt den Wert 0 an, wenn keine Beeinträchtigung vorliegt, die untersuchte Mutante also gleich starke Regulations-eigenschaften zeigt wie die mit PPAR β/δ Wildtyp rekonstituierten Zellen. Wird der betrachtete Regulationstyp hingegen durch die Mutation beeinflusst, so ergibt sich ein negativer Wert für eine abgeschwächte Ligandenresponsivität und ein positiver Wert bei einer verstärkten Regulation durch den Liganden. Vor der Berechnung der Messgröße \log_2 (Ratio) wurde beim inversen Agonisten zunächst der Repressionsfaktor und beim Agonisten der Aktivierungsfaktor bestimmt. Anschließend wurde der berechnete Regulationsfaktor der Mutante mit dem erzielten Regulationsfaktor des Wildtyps in Relation gesetzt und der Logarithmus zur Basis 2 angewendet. Die Berechnungen wurden anhand der folgenden Formeln durchgeführt:

$$(2) \quad \text{Repressionsfaktor (inv. Agonist)} = 1 / \text{relative } \textit{ANGPTL4} \text{ Expression bei Behandlung}$$

$$(3) \quad \text{Aktivierungsfaktor (Agonist)} = \text{relative } \textit{ANGPTL4} \text{ Expression bei Behandlung}$$

$$(4) \quad \text{Messgröße } \log_2 \text{ (Ratio)} = \log_2 (\text{Regulationsfaktor Mutante} / \text{Regulationsfaktor Wildtyp})$$

Bei jedem Aussäen von Mutanten für die Behandlung mit PPAR β/δ -Liganden wurden parallel die zeitgleich mit dem PPAR β/δ Wildtyp Konstrukt infizierten 2B3 Zellen ausgesät und ebenfalls behandelt. In ersten Experimenten während der Masterarbeit wurden jeweils die Werte der Wildtyp-Kontrolle innerhalb desselben Assays für die Berechnungen herangezogen. Im Verlauf der experimentellen Arbeiten zeigte sich jedoch eine gewisse Variation des basalen *ANGPTL4* Transkriptlevels und der Ligandenresponsivität in den jeweils mit PPAR β/δ Wildtyp Konstrukten rekonstituierten Zellen. Diese technischen und biologischen Schwankungen des RT-qPCR-basierten *Readouts* erschwerten einen direkten Vergleich einzelner Mutanten und die Beurteilung einer Beeinträchtigung der Regulation durch PPAR β/δ . Für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde daher auf eine einheitliche Referenz für alle Mutanten zurückgegriffen. Dazu wurden für die oben beschriebenen Berechnungen die Mittelwerte aus 19 biologischen Replikaten von Wildtyp PPAR β/δ -rekonstituierten 2B3 Zellen herangezogen.

4.5.2 Übersicht über die Ergebnisse des funktionellen Screens

Die 2B3 PPAR β/δ -Mutanten wurden wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben hergestellt und mit PPAR β/δ -Liganden behandelt. Anschließend wurde eine RT-qPCR mit der isolierten und revers transkribierten RNA durchgeführt. Mit Ausnahme der 21 erst in dieser Arbeit klonierten Konstrukte (Plasmidauflistung in Kapitel 2.4.3) wurde jeweils die erste Messung in der Masterarbeit durchgeführt. Alle weiteren Daten sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert worden. Tabelle 28 auf den beiden nächsten Seiten zeigt die gemessenen basalen Ct-Werte, die relative *ANGPTL4* Expression bei Ligandenbehandlung sowie die errechneten log₂ (Ratio) Werte (Kapitel 4.5.1) für 80 PPAR β/δ -Mutanten. Als Position ist in der Regel das Sekundärstrukturelement angegeben, in dem die betreffende Aminosäure liegt (Abbildung 35). Für eine bessere Übersichtlichkeit sind die Daten aus Tabelle 28 auf den nachfolgenden Seiten in Abbildung 36 graphisch und in Tabelle 29 in vereinfachter Form zusammenfassend dargestellt.

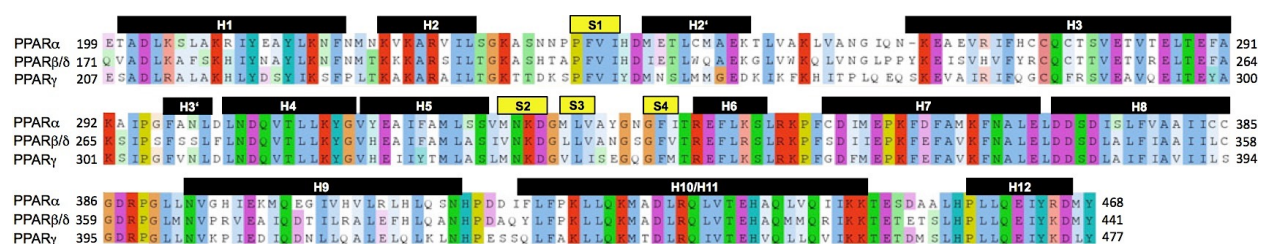


Abbildung 35: Sekundärstrukturbereiche der PPARs. Sequenz-Alignment der drei PPAR-Kernrezeptoren mit Angabe der Sekundärstrukturelemente. Modifiziert aus Zoete *et al.* 2007 unter Anpassung der Angaben der Aminosäurenummern für PPAR β/δ , sodass diese nun mit der angewendeten Nomenklatur der Mutanten übereinstimmen. H = Helix, S = β -Faltblatt

Mutante	Position	basale Rep.		PT-S264 (300 nM)			L165,041 (1 µM)			n
		Ct	Diff. WT	rel. Exp.	SD	log ₂ (Ratio)	rel. Exp.	SD	log ₂ (Ratio)	
WT (Mean)		28,9	0,0	0,189	0,048	0,00	19,840	6,979	0,00	19
72-441	ΔAF1	27,0	-1,9	0,379	0,105	-1,00	6,586	3,113	-1,59	3
C91A-E92A	DBD	27,3	-1,6	1,020	0,194	-2,43	1,220	0,173	-4,02	8
G146A	RFGR	26,0	-2,9	0,877	0,090	-2,21	1,266	0,060	-3,97	1
R147K	RFGR	27,4	-1,5	0,184	0,034	0,04	6,869	0,870	-1,53	1
R154K	Hinge	28,0	-0,9	0,240	0,051	-0,34	16,000	1,711	-0,31	1
K155R	Hinge	28,4	-0,5	0,193	0,098	-0,03	20,393	2,208	0,04	1
K229R	zw. H2'/H3	28,5	-0,4	0,291	0,034	-0,62	19,027	1,684	-0,06	1
K239R	H3	29,6	0,7	0,283	0,084	-0,58	28,247	3,346	0,51	1
E240A	H3	30,1	1,2	0,363	0,085	-0,94	16,111	3,019	-0,30	1
V254A	H3	30,4	1,5	0,651	0,225	-1,78	24,062	7,498	0,28	2
V254R	H3	29,6	0,7	0,464	0,106	-1,30	1,508	0,151	-3,72	2
V257R	H3	27,0	-1,9	1,012	0,142	-2,42	1,250	0,260	-3,99	3
T261R	H3	26,8	-2,1	0,982	0,136	-2,38	1,366	0,179	-3,86	3
V279R	H4	26,8	-2,1	0,650	0,030	-1,78	1,128	0,077	-4,14	3
T261R-V279R	H3/4	26,7	-2,2	0,898	0,016	-2,25	1,035	0,007	-4,26	2
L281A	H4	28,2	-0,7	0,503	0,090	-1,41	11,158	1,335	-0,83	1
K283A	H4	28,7	-0,2	0,516	0,059	-1,45	2,782	0,823	-2,83	2
K300A	S2	29,1	0,2	0,295	0,094	-0,64	24,930	2,444	0,33	1
K300R	S2	29,0	0,1	0,149	0,083	0,34	23,918	2,663	0,27	1
R314A	H6	26,5	-2,4	0,083	0,031	1,19	5,084	1,219	-1,96	5
R314K	H6	28,8	-0,1	0,163	0,033	0,21	14,221	1,954	-0,48	1
E315A	H6	29,1	0,2	0,204	0,042	-0,11	17,268	1,795	-0,20	1
R318A	H6	28,8	-0,1	0,199	0,044	-0,07	13,830	2,605	-0,52	1
R318K	H6	29,2	0,3	0,124	0,018	0,61	25,634	4,667	0,37	1
R321A	zw. H6/H7	30,8	1,9	0,547	0,061	-1,53	33,591	3,374	0,76	1
R321K	zw. H6/H7	28,1	-0,8	0,780	0,023	-2,05	7,312	2,103	-1,44	3
K322A	zw. H6/H7	28,0	-0,9	0,186	0,034	0,02	18,379	2,493	-0,11	1
K322R	zw. H6/H7	28,4	-0,5	0,186	0,038	0,02	12,295	1,734	-0,69	1
F324A	zw. H6/H7	28,1	-0,8	0,540	0,183	-1,51	2,269	0,198	-3,13	3
D326A	H7	30,3	1,4	0,454	0,092	-1,26	49,180	7,973	1,31	1
I327A	H7	31,6	2,7	0,675	0,201	-1,84	7,950	3,227	-1,32	3
I328A	H7	30,7	1,8	0,406	0,028	-1,10	26,355	1,582	0,41	1
E329A	H7	26,6	-2,3	0,179	0,034	0,08	5,595	0,566	-1,83	3
E333A	H7	28,7	-0,2	0,136	0,067	0,47	10,411	1,653	-0,93	1
A404K	H10/11	27,1	-1,8	0,979	0,104	-2,37	2,346	0,263	-3,08	1
A404W	H10/11	27,4	-1,5	0,774	0,086	-2,03	2,549	0,252	-2,96	1
L406R	H10/11	26,5	-2,4	1,057	0,111	-2,48	1,206	0,124	-4,04	1
H413A	H10/11	28,1	-0,8	0,454	0,088	-1,26	3,294	0,381	-2,59	1
H413W	H10/11	28,5	-0,4	0,920	0,090	-2,28	1,196	0,189	-4,05	5
M416A	H10/11	28,9	0,0	0,358	0,070	-0,92	30,484	2,966	0,62	1
M416K	H10/11	28,0	-0,9	0,268	0,040	-0,50	15,455	1,913	-0,36	1
M416R	H10/11	30,5	1,6	0,218	0,056	-0,21	22,943	4,186	0,21	1
M417A	H10/11	29,4	0,5	0,515	0,083	-1,45	12,405	2,419	-0,68	2
I420A	H10/11	29,5	0,6	0,354	0,118	-0,91	13,269	2,499	-0,58	1
I420R	H10/11	27,8	-1,1	0,502	0,153	-1,41	5,152	0,054	-1,95	2
K421A	H10/11	24,9	-4,0	0,043	0,004	2,14	4,412	1,176	-2,17	3

Mutante	Position	basale Rep.		PT-S264 (300 nM)			L165,041 (1 µM)			n
		Ct	Diff. WT	rel. Exp.	SD	log ₂ (Ratio)	rel. Exp.	SD	log ₂ (Ratio)	
K421R	H10/11	26,9	-2,0	0,095	0,005	0,99	7,632	1,816	-1,38	2
K422A	H10/11	28,7	-0,2	0,133	0,013	0,51	32,728	4,286	0,72	2
K422R	H10/11	28,0	-0,9	0,182	0,066	0,05	13,455	0,093	-0,56	2
K421A-K422A	H10/11	26,4	-2,5	0,037	0,009	2,35	3,346	0,264	-2,57	6
K421R-K422R	H10/11	27,4	-1,5	0,104	0,025	0,86	13,107	0,726	-0,60	2
T423A	L-Box	31,1	2,2	0,678	0,049	-1,84	43,518	9,927	1,13	2
T423D	L-Box	29,2	0,3	0,257	0,042	-0,44	30,484	4,059	0,62	1
E424A	L-Box	28,8	-0,1	0,262	0,084	-0,47	15,137	3,025	-0,39	1
T425A	L-Box	29,9	1,0	0,426	0,060	-1,17	44,632	5,241	1,17	1
T425D	L-Box	30,1	1,2	0,374	0,075	-0,98	41,355	5,207	1,06	1
E426A	L-Box	27,9	-1,0	0,306	0,065	-0,70	15,560	1,320	-0,35	1
T427A	L-Box	28,2	-0,7	0,140	0,038	0,43	15,137	1,517	-0,39	1
T427F	L-Box	26,6	-2,3	0,112	0,028	0,75	9,189	1,515	-1,11	2
T427I	L-Box	26,2	-2,7	0,037	0,018	2,35	3,307	0,561	-2,58	8
T427D	L-Box	31,5	2,6	0,465	0,138	-1,30	15,263	5,367	-0,38	5
T423A-T427A	L-Box	29,8	0,9	0,415	0,172	-1,13	48,961	18,688	1,30	2
T423D-T427D	L-Box	30,2	1,3	0,840	0,227	-2,15	18,292	5,094	-0,12	3
T423A-T427D	L-Box	29,4	0,5	0,505	0,090	-1,42	7,010	0,990	-1,50	2
T423D-T427A	L-Box	28,8	-0,1	0,230	0,039	-0,28	28,791	0,989	0,54	3
S428A	L-Box	27,7	-1,2	0,142	0,014	0,41	22,486	3,326	0,18	2
S428D	L-Box	29,3	0,4	0,342	0,054	-0,86	36,002	5,205	0,86	1
L429A	LXXLL	29,9	1,0	0,926	0,424	-2,29	2,904	1,947	-2,77	3
H430K	LXXLL	30,1	1,2	0,271	0,126	-0,52	2,770	0,444	-2,84	1
L432A	LXXLL, H12	30,8	1,9	1,020	0,392	-2,43	2,904	0,147	-2,77	3
L432I	LXXLL, H12	30,3	1,4	0,525	0,229	-1,47	19,562	6,226	-0,02	1
L433A	LXXLL, H12	29,2	0,3	0,482	0,050	-1,35	1,216	0,067	-4,03	2
L433F	LXXLL, H12	31,0	2,1	0,708	0,164	-1,91	1,382	0,204	-3,84	3
L433I	LXXLL, H12	30,9	2,0	0,742	0,054	-1,97	31,651	24,418	0,67	3
E435A	H12	29,1	0,2	0,367	0,043	-0,96	4,089	0,766	-2,28	3
Y437F	H12	28,1	-0,8	0,137	0,025	0,46	8,694	1,134	-1,19	1
Y437A	H12	29,5	0,6	0,591	0,050	-1,64	1,461	0,234	-3,76	3
D439A	H12	26,3	-2,6	0,836	0,120	-2,15	1,486	0,360	-3,74	3
1-421	ΔL-Box+AF2	28,6	-0,3	0,382	0,044	-1,02	1,233	0,068	-4,01	3
1-428	ΔAF2	28,5	-0,4	0,426	0,079	-1,17	1,040	0,199	-4,25	3
LV		26,3	-2,6	0,993	0,116	-2,39	1,273	0,234	-3,96	9

Tabelle 28: Screen von 80 PPARβ/δ Mutanten auf eine Beeinträchtigung der Ligandenresponsivität

basale Rep. = basale Repression, Ct = normalisierter Ct der DMSO-Kontrolle, Diff. WT = Differenz des Ct der DMSO-Kontrolle im Vergleich zum Wildtyp, rel. Exp. = relative *ANGPTL4* Expression, SD = Standardabweichung, n = Anzahl biologische Replikate (gelb für n > 1), H = Helix, S = β-Faltblatt, zw. = zwischen
rot: Beeinträchtigung des betreffenden Effektes (Diff. WT ≤ -1,5; log₂ (Ratio) ≤ -1,5)
grün: Verstärkung des betreffenden Effektes (Diff. WT ≥ 1,5; log₂ (Ratio) ≥ 1,5)

Der Cutoff wurde sowohl für die basale Repression als auch für die Ligandenresponsivität auf ± 1,5 festgelegt, was einer 2^{1,5}- bzw. 2,8-fachen Veränderung gegenüber dem Wildtyp entspricht. Das Erreichen des Cutoffs ist durch eine rote bzw. grüne Markierung hervorgehoben.

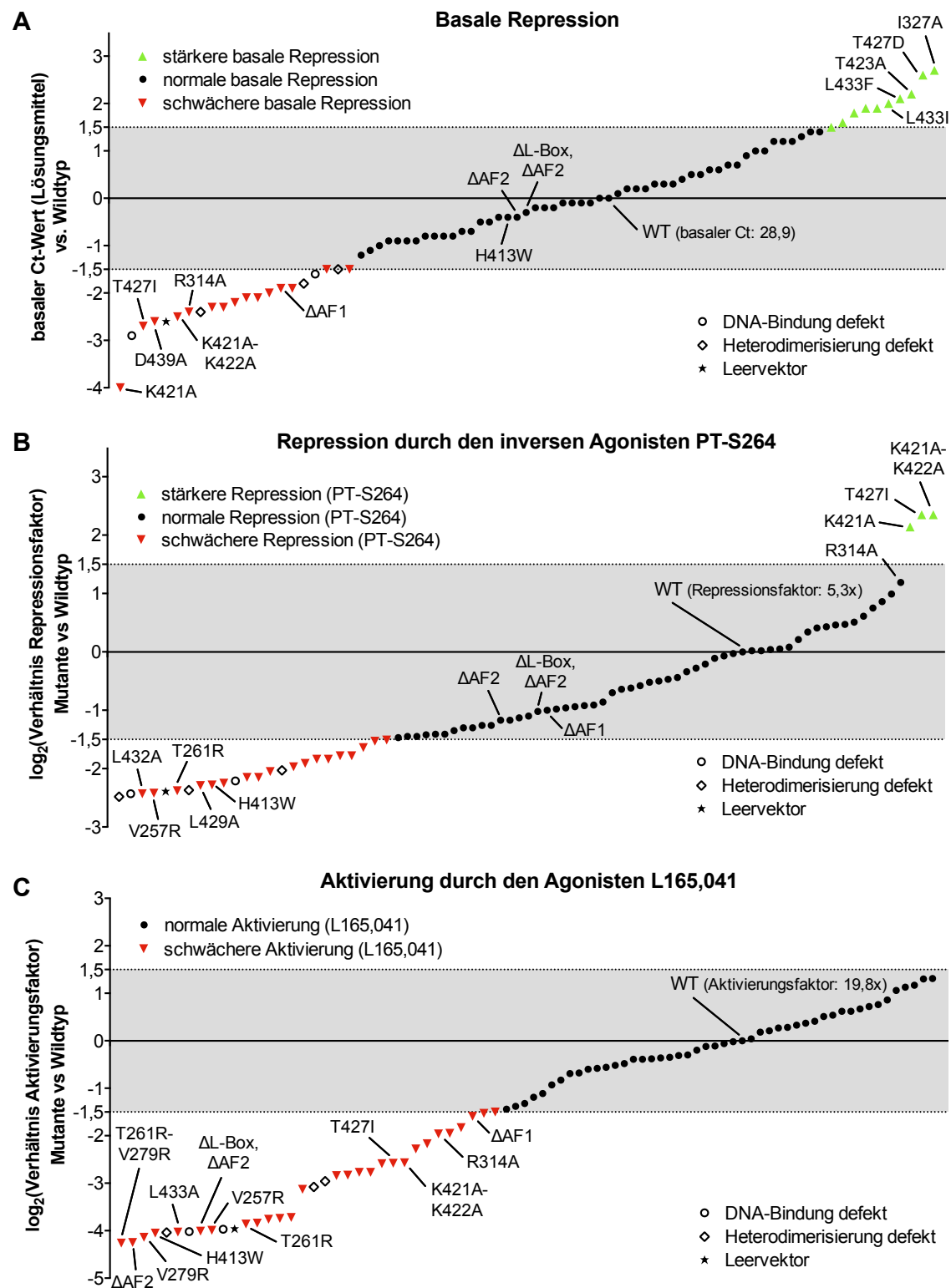


Abbildung 36: Graphische Zusammenfassung des retroviralen Rekonstitutionsscreens mit 80 PPAR β/δ Mutanten. A) Auswirkungen der untersuchten Mutationen auf die basale Repression. Dargestellt ist die Differenz des mittleren basalen Ct-Werts der Mutante im Vergleich zum mittleren basalen Ct-Wert aus 19 biologischen Replikaten des Wildtyps (Ct 28,9). B-C) Auswirkungen der untersuchten Mutationen auf die transkriptionelle Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 (B) bzw. auf die transkriptionelle Aktivierung von *ANGPTL4* durch den PPAR β/δ Agonisten L165,041 (C). Dargestellt sind die jeweils berechneten Werte für \log_2 (Ratio) aus Tabelle 28.

Mutation	basale Rep.	PT-S264	L165,041	Position	Mutation	basale Rep.	PT-S264	L165,041	Position
72-441 (dAF1)	-	•	-	ΔAF1	M416K	•	•	•	H10/11
C91A-E92A	-	-	-	Hinge	M416R	+	•	•	H10/11
G146A	-	-	-	RFGR	M417A	•	•	•	H10/11
R147K	-	•	-	RFGR	I420A	•	•	•	H10/11
R154K	•	•	•	Hinge	I420R	•	•	-	H10/11
K155R	•	•	•	Hinge	K421A	-	+	-	H10/11
K229R	•	•	•	zw. H2'/H3	K421R	-	•	•	H10/11
K239R	•	•	•	H3	K422A	•	•	•	H10/11
E240A	•	•	•	H3	K422R	•	•	•	H10/11
V254A	+	-	•	H3	K421A-K422A	-	+	-	H10/11
V254R	•	•	-	H3	K421R-K422R	-	•	•	H10/11
V257R	-	-	-	H3	T423A	+	-	•	L-Box
T261R	-	-	-	H3	T423D	•	•	•	L-Box
V279R	-	-	-	H4	E424A	•	•	•	L-Box
T261R-V279R	-	-	-	H3/H4	T425A	•	•	•	L-Box
L281A	•	•	•	H4	T425D	•	•	•	L-Box
K283A	•	•	-	H4	E426A	•	•	•	L-Box
K300A	•	•	•	S2	T427A	•	•	•	L-Box
K300R	•	•	•	S2	T427F	-	•	•	L-Box
R314A	-	•	-	H6	T427I	-	+	-	L-Box
R314K	•	•	•	H6	T427D	+	•	•	L-Box
E315A	•	•	•	H6	T423A-T427A	•	•	•	L-Box
R318A	•	•	•	H6	T423D-T427D	•	-	•	L-Box
R318K	•	•	•	H6	T423A-T427D	•	•	-	L-Box
R321A	+	-	•	zw. H6/H7	T423D-T427A	•	•	•	L-Box
R321K	•	-	•	zw. H6/H7	S428A	•	•	•	L-Box
K322A	•	•	•	zw. H6/H7	S428D	•	•	•	L-Box
K322R	•	•	•	zw. H6/H7	L429A	•	-	-	LXXLL
F324A	•	-	-	zw. H6/H7	H430K	•	•	-	LXXLL
D326A	•	•	•	H7	L432A	+	-	-	LXXLL, H12
I327A	+	-	•	H7	L432I	•	•	•	LXXLL, H12
I328A	+	•	•	H7	L433A	•	•	-	LXXLL, H12
E329A	-	•	-	H7	L433F	+	-	-	LXXLL, H12
E333A	•	•	•	H7	L433I	+	-	•	LXXLL, H12
A404K	-	-	-	H10/11	E435A	•	•	-	H12
A404W	-	-	-	H10/11	Y437A	•	-	-	H12
L406R	-	-	-	H10/11	Y437F	•	•	•	H12
H413A	•	•	-	H10/11	D439A	-	-	-	H12
H413W	•	-	-	H10/11	1-421	•	•	-	ΔL-Box+AF2
M416A	•	•	•	H10/11	1-428	•	•	-	ΔAF2

Tabelle 29: Zusammenfassung des retroviralen Rekonstitutionsscreens mit 80 PPARβ/δ Mutanten

[•] = keine Beeinträchtigung der Regulation, [-] = schwächere Regulation, [+] = stärkere Regulation

basale Rep. = basale Repression, H = Helix, S = β-Faltblatt, zw. = zwischen

In Abbildung 37 sind die Daten des Rekonstitutionsscreens in Form eines Venn-Diagramms dargestellt. Dabei wird lediglich eine Beeinträchtigung der Regulationstypen betrachtet, während eine verstärkte Regulation in dieser Darstellung nicht berücksichtigt werden konnte. Von 80 untersuchten Mutanten zeigen 37 unter Anwendung des zuvor beschriebenen Cutoffs von 1,5 für die berechneten Messgrößen keine Beeinträchtigung der Regulation durch PPAR β/δ (violett Textfeld unterhalb des Venn-Diagramms). Bei 20 Mutanten wird ein Verlust der basalen Repression beobachtet. Die verstärkte Repression der *ANGPTL4* Transkription durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 ist bei 23 Mutanten beeinträchtigt. Eine Beeinträchtigung der Aktivierung durch den PPAR β/δ Agonisten L165,041 ist in 33 Mutanten zu verzeichnen. Wie aus dem Venn-Diagramm in Abbildung 37 hervorgeht, haben 23 untersuchte Mutationen Auswirkungen auf mehr als einen Regulationstyp. So zeigt sich in zehn Mutanten eine Beeinträchtigung sowohl der basalen Repression als auch der Regulation durch beide Ligandentypen. Dieser generelle Funktionsverlust kann in zwei Mutanten auf eine defekte DNA-Bindung zurückgeführt werden, während er in drei weiteren Fällen mutmaßlich aus einem Defekt der Heterodimerisierung mit RXR resultiert.

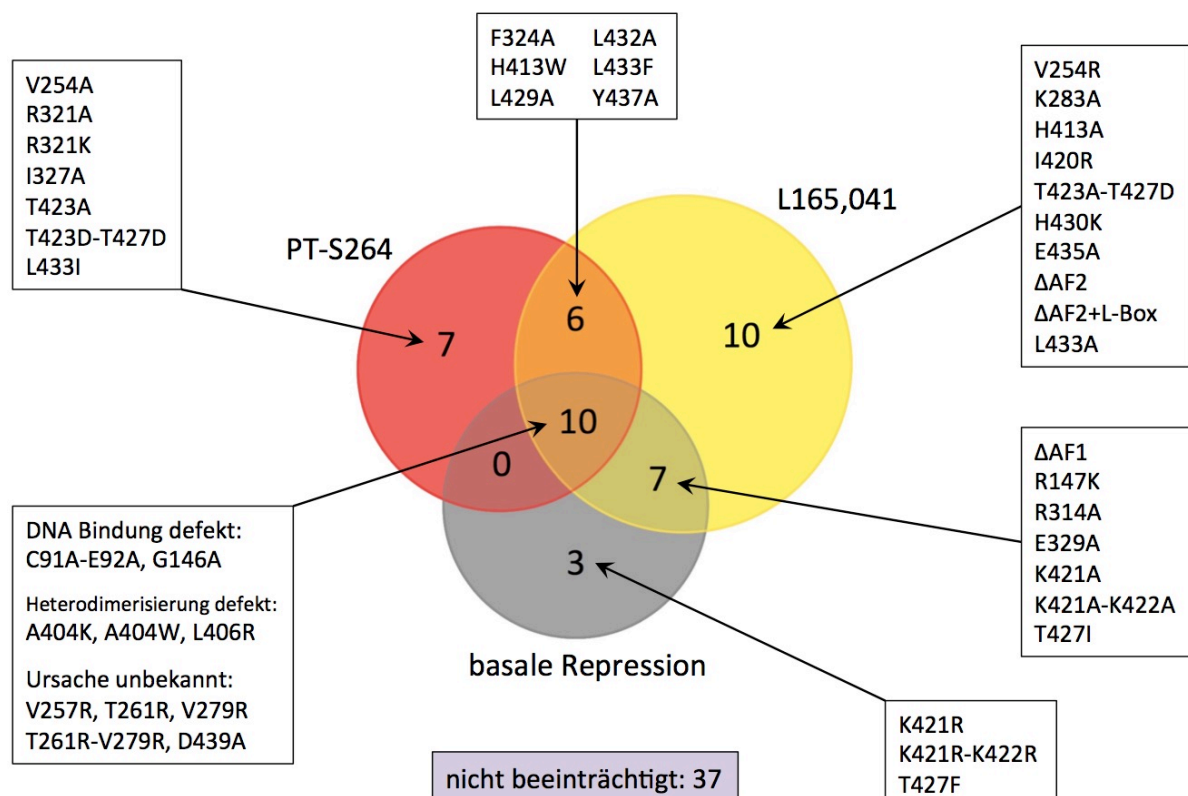


Abbildung 37: Venn-Diagramm, Auswirkungen von 80 untersuchten Mutationen auf die transkriptionelle Regulation von *ANGPTL4* durch PPAR β/δ . Das Venn-Diagramm zeigt eine Übersicht über die Beeinträchtigung der untersuchten Regulationstypen basale Repression (grauer Kreis), verstärkte Repression durch den inversen Agonisten PT-S264 (roter Kreis) und Aktivierung durch den Agonisten L165,041 (gelber Kreis) in den 80 untersuchten Mutanten. Zugrunde gelegt wurden die Daten aus Tabelle 28. Die betreffenden Mutanten sind in den umliegenden Textfeldern aufgeschlüsselt.

Sieben Mutanten weisen einen Verlust der basalen Repression und eine Schwächung der Aktivierung durch den Agonisten auf. Wie aus Abbildung 36B ersichtlich wird, zeigen drei (vier mit R314A knapp unter dem Cutoff) gleichzeitig eine Verstärkung der Repression durch den inversen Agonisten. Bei acht Mutanten kommt es zum Verlust der Responsivität auf beide Liganden, während die basale Repression unbeeinflusst bleibt. Auffällig ist, dass keine der Mutanten einen Verlust der basalen Repression und der Repression durch den inversen Agonisten zeigt, ohne dass gleichzeitig auch die Aktivierung durch den Agonisten beeinträchtigt ist. Abbildung 38 gibt einen Überblick über die Position einiger interessant erscheinender Mutationen. Eine genauere Betrachtung der einzelnen Mutanten erfolgt in den nachfolgenden Kapiteln, insbesondere in Kapiteln der Diskussion.

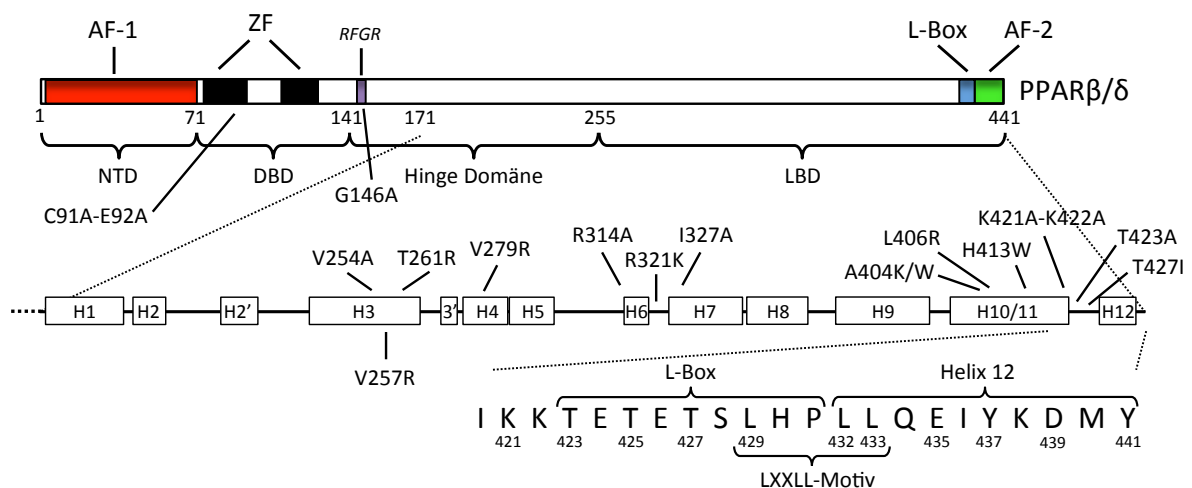


Abbildung 38: Schematische Übersicht über die Position einiger Mutationen. Dargestellt ist eine schematische Übersicht des PPARβ/δ Proteins (obere Ebene). Die Strukturelemente (Helices) der LBD sind in der mittleren Ebene aufgeschlüsselt. Im Bereich der AF-2 sind Sequenzelemente wie die L-Box (Loop zwischen Helix 11 und 12) und das LXXLL-Motiv angegeben (untere Ebene). Gezeigt ist die Lokalisation einzelner Mutanten, die aufgrund einer Beeinträchtigung oder aber Verstärkung der transkriptionellen Repression durch den inversen PPARβ/δ Agonisten PT-S264 besonders interessant erscheinen.

4.5.3 Deletionsmutanten ΔAF1, ΔAF2 und ΔL-Box+AF2

Neben zahlreichen Punktmutanten wurden auch drei Deletionsmutanten generiert, um eine Beteiligung der Aktivierungsfunktionen AF1 und AF2 sowie des Loops zwischen Helix 11 und 12 (L-Box) am Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPARβ/δ Agonisten zu überprüfen. Bei Betrachtung der Kristallstrukturen der PPARα LBD bei Bindung eines inversen Agonisten und bei Bindung eines Agonisten, fällt auf, dass die Helix 12, welche die AF2 repräsentiert, eine deutliche Konformationsänderung vollzieht (Abbildung 39 nächste Seite, siehe auch Kapitel 1.1.6) Aufgrund dieser Beobachtung wurde insbesondere eine Rolle der AF2 beim untersuchten Mechanismus als wahrscheinlich erachtet.

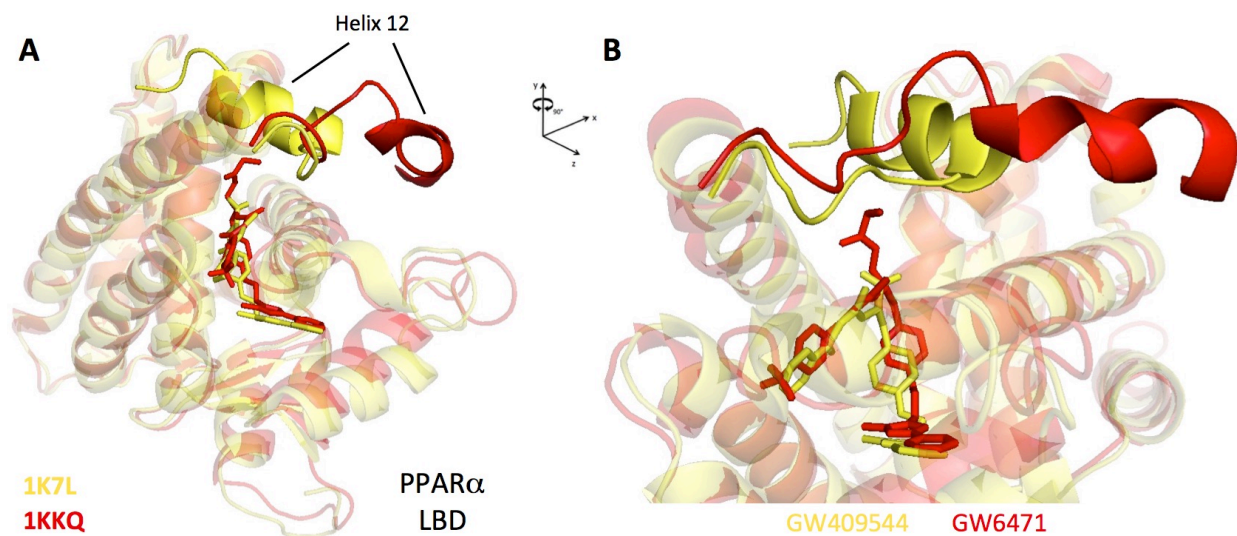


Abbildung 39: Ligandenabhängige Konformationsänderung der Helix 12. A) Überlagerung der Kristallstrukturen der PPAR α LBD bei Bindung eines Agonisten (gelb, PDB ID 1K7L ^[306], GW409544) bzw. eines inversen Agonisten (rot, PDB ID 1KKQ ^[307], GW6471). Ist der Agonist gebunden, so nimmt die Helix 12 eine angewinkelte Konformation ein und ist über der Ligandenbindungstasche positioniert. Bei Bindung des inversen Agonisten, drückt der Richtung Helix 12 verlängerte inverse Agonist diese aus der Ligandenbindungstasche, woraufhin die Helix 12 eine von der LBD abstehende Konformation einnimmt. B) siehe A, Darstellung aus einem seitlichen Blickwinkel und etwas vergrößert.

Der Ligand GW6471, der in der Kristallstruktur mit der PDB ID 1KKQ an PPAR α gebunden hat, wird in der zugehörigen Publikation von Xu *et al.* 2001 ^[307] als Antagonist bezeichnet. Allerdings wird dieser Begriff übergeordnet sowohl für inverse Agonisten als auch für neutrale Antagonisten gebraucht ^[273]. Neutrale Antagonisten stören durch Konkurrenz die Bindung von Agonisten sowie inversen Agonisten und modulieren so die Transkription hin zum ligandenfreien Zustand (Anhang, Abb. Z6) ^[273]. Die Eigenschaft von GW6471, durch die Rekrutierung von Co-Repressoren eine Repression der Transkription unter das Basalniveau zu bewirken, legt eine Einordnung des Liganden als inverser Agonist nahe. Daher wird der Ligand hier als inverser Agonist bezeichnet.

Wie bereits in Kapitel 1.6.2 erläutert, wurde bislang keine Kristallstruktur der PPAR β/δ -LBD bei Bindung eines inversen Agonisten publiziert. Aus diesem Grund werden für die Interpretation der Ergebnisse des Rekonstitutionsscreens die Kristallstrukturen der PPAR α -LBD bei Bindung eines Agonisten (PDB ID 1K7L ^[306], GW409544) bzw. eines inversen Agonisten (PDB ID 1KKQ ^[307], GW6471) herangezogen (Abbildung 39). Die Überlagerung der PPAR α und PPAR β/δ LBDs (z. B. PDB ID 3TKM) bei Bindung eines jeweiligen Agonisten ergab eine nahezu perfekte Übereinstimmung auf Ebene der Sekundärstrukturelemente, sodass es nicht unwahrscheinlich ist, dass auch die Konformationsänderung der Helix 12 bei Bindung eines inversen Agonisten vergleichbar sein könnte. Dennoch könnten mit einer Kristallstruktur PPAR β/δ bei Bindung eines inversen Agonisten (im Optimalfall mit dem verwendeten inversen Agonisten PT-S264) natürlich

verlässlichere Aussagen zum Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten getroffen werden. Die Auflösung einer entsprechenden Kristallstruktur von PPAR β/δ mit einem inversen Agonisten ist daher ein Ziel des übergeordneten Projektes, an dem bis Anfang 2019 Iris Nee ^[203] vom Arbeitskreis Diederich gearbeitet hat und das seither von Phil Hochban weitergeführt wird.

Die Deletionsmutante 72-441 (Δ AF1) zeigt eine Beeinträchtigung der basalen Repression und eine Schwächung der Aktivierung durch den Agonisten. Bei den Deletionsmutanten 1-428 (Δ AF2) und 1-421 (Δ L-Box + AF2) wird ein vollständiger Verlust der transkriptionellen Aktivierung von *ANGPTL4* durch den Agonisten beobachtet. Sowohl die basale Repression als auch die verstärkte Repression durch den inversen Agonisten bleibt von diesen beiden Deletionen nahezu unbeeinflusst.

4.5.4 Punktmutationen in der L-Box und der Helix 12

Der C-Terminus von PPAR β/δ erscheint aufgrund der starken ligandeninduzierten Konformationsänderung besonders interessant. Daher wurden neben den C-terminalen Deletionsmutanten (Δ AF2 und Δ L-Box+AF2) auch zahlreiche Punktmutationen in diesem Bereich eingefügt und die Mutanten im funktionellen Screen untersucht. Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, enthält der C-Terminus die L-Box (Loop zwischen Helix 11 und 12 ^[154]) und die Helix 12 (AF2) sowie die am Übergang von Loop zu Helix befindliche *Nuclear Receptor Box* (NR-Box, LXXLL-Motiv).

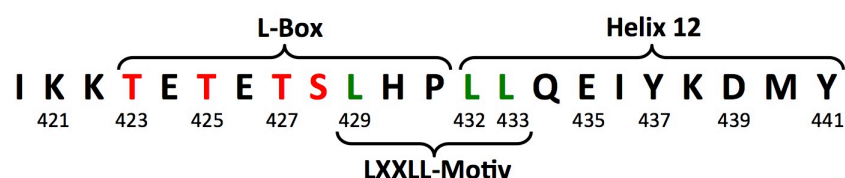


Abbildung 40: Sequenz des PPAR β/δ C-Terminus. Die letzten 19 Aminosäuren von PPAR β/δ formen in der Tertiärstruktur den Loop zwischen den Helices 11 und 12 sowie die AF2-Helix (Helix 12). In der L-Box befindet sich die Sequenz TETETS, die von Kinasen erkannt werden kann, die daraufhin unterschiedliche Aminosäuren phosphorylieren könnten (rot). Am Übergang von L-Box zu Helix befindet sich ein LXXLL-Motiv (grün).

Die L-Box enthält das Motiv TETETS, das von Kinasen erkannt und an verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert werden könnte. Daher wurden hier an den entsprechenden Stellen sowohl *non-phospho* Mutanten (Mutation zu einem Alanin) als auch *phospho-mimic* Mutanten (Mutation zu einem Aspartat, das der phosphorylierten Form von Threonin ähnelt) generiert. Im funktionellen Screen führen innerhalb des TETETS-Motivs nur die Mutationen der Threonine 423 und 427 zu Beeinträchtigungen der transkriptionellen Regulation durch PPAR β/δ . Bei Thre-

onin 423 bewirkt die Mutation zu einem Alanin eine verstärkte basale Repression, die mit einer verminderten Repression durch den inversen Agonisten und einer leicht verstärkten Aktivierung durch den Agonisten (unterhalb des Cutoffs) einhergeht. Eine Mutation dieser Aminosäure zu einem Aspartat (*phospho-mimic*) führt zu keiner Beeinträchtigung. Bei Threonin 427 begünstigt hingegen die *phospho-mimic* Mutante T427D die basale Repression bei einer leichten Schwächung der Repression durch den inversen Agonisten (unterhalb des Cutoffs). In der Doppelmutante T423A-T427D sind die beobachteten Effekte überraschenderweise schwächer ausgeprägt als in den Einzelmутanten. Die *non-phospho* Mutanten der Aminosäure T427 bewirken hingegen eine Schwächung der basalen Repression. Das Ausmaß dieses Effektes ist abhängig davon, durch welche Aminosäure das Threonin ersetzt wird. Bei der Mutation zu einem Alanin deutet sich zwar bereits eine Schwächung an, diese liegt allerdings noch deutlich unter dem Cutoff. Die Mutation zu einem Phenylalanin hat eine deutlich stärkere Beeinträchtigung der basalen Repression zur Folge. Besonders drastisch fällt der Effekt bei der Mutation zu einem Isoleucin aus. Hier geht der Verlust der basalen Repression mit einer verstärkten Repression durch den inversen Agonisten und einer geschwächten Aktivierung durch den Agonisten einher.

Die *Nuclear Receptor Box* (LXXLL-Motiv) ist ein Strukturmotiv, das von vielen Co-Aktivatoren genutzt wird, um an Kernrezeptoren zu binden. Doch die PPARs tragen in ihrer C-terminalen Domäne ebenfalls ein solches Motiv (Abbildung 40). Bei jedem der drei Leucine führt die Mutation zu einem Alanin zum Verlust der Aktivierung durch den Agonisten L165,041. Die Mutanten L429A und L432A zeigen außerdem einen Verlust der Repression durch den inversen Agonisten PT-S264, während dieser Regulationstyp in der Mutante L433A lediglich leicht geschwächt ist (unterhalb des Cutoffs). In der Mutante L432A scheint die basale Repression begünstigt zu sein. Bei der Mutation des zweiten Leucins zu einem Isoleucin ist diese Begünstigung weniger stark ausgeprägt und auch der Einfluss auf die Repression durch den inversen Agonisten ist geringer (beides unterhalb des Cutoffs). Die Aktivierung durch den Agonisten bleibt in dieser Mutante erhalten. Durch die Mutationen von Leucin 433 zu einem Isoleucin oder Phenylalanin kommt es zu einer Verstärkung der basalen Repression. In beiden Mutanten ist die Repression durch den inversen Agonisten geschwächt, während nur die Phenylalanin-Mutante zusätzlich zu einem Verlust der Aktivierung durch den Agonisten führt.

Bei den Punktmutationen in Helix 12 beeinträchtigt die Mutation des Glutamat an Position 435 zu einem Alanin und die Mutation von Histidin 430 zu einem Lysin die Aktivierung durch den Agonisten. Die Mutante D439A zeigt einen Verlust aller drei betrachteten Regulationstypen (siehe Kapitel 4.5.5). Durch die Mutation von Tyrosin 437 zu einem Alanin kommt es zum Verlust der Aktivierung durch den Agonisten und zu einer Schwächung der Repression durch den inversen Agonisten, während die Mutation zu einem Phenylalanin kaum Auswirkungen zeigt (unterhalb des Cutoffs).

4.5.5 Beeinträchtigung aller drei transkriptionellen Regulationstypen

Wie bereits in Kapitel 4.5.2 angesprochen, führen zehn der untersuchten Mutationen sowohl zur Beeinträchtigung der basalen Repression als auch zum Verlust der Ligandenresponsivität von PPAR β/δ auf beide Ligandentypen (Agonist und inverser Agonist). Die Mutation C91A-E92A ist in der DNA-bindenden Domäne von PPAR β/δ lokalisiert. Bei G146 handelt es sich um das Glycin innerhalb des RFGR-Motivs am Anfang der *Hinge*-Domäne. Drei der betroffenen Mutationen (A404, A404W und L406R) sind in Helix 10 der LBD zu finden. Die Mutationen V257R, T261R, V279R und T261-V279R liegen im Bereich der Helices 3 und 4 der LBD, während die Mutation D439A in Helix 12 lokalisiert ist.

4.5.6 Beeinträchtigung der Liganden-vermittelten transkript. Regulation

Zusätzlich zu den bereits besprochenen Mutationen im C-Terminus, führen die Mutationen F324A, H413W und I420R (beim inversen Agonist knapp unterhalb des Cutoffs) zur Beeinträchtigung beider Liganden-vermittelter Regulationstypen. Phenylalanin 324 sitzt am Anfang von Helix 7. Die Aminosäuren H413 und I420 befinden sich in Helix 11.

4.5.7 Beeinträchtigung der Repression durch den inversen Agonisten

Neben den bereits besprochenen Mutationen innerhalb des C-Terminus bewirken die Mutationen V254A, R321A, R321K und I327A eine verminderte Repression durch den inversen Agonisten PT-S264. Insbesondere bei der Mutante I327A, schwächer auch bei V254A fällt parallel eine verstärkte basale Repression auf. Das Valin 254 ist Teil von Helix 3, während die übrigen Mutationen zwischen Helix 6 und 7 bzw. innerhalb von Helix 7 lokalisiert sind.

4.5.8 Beeinträchtigung der basalen Repression

Die Mutanten K421R, K421R-K422R und T427F weisen eine verminderte basale Repression auf. In den Mutanten Δ AF1, R147K, R314A, E329A, K421A, K421A-K422A und T427I geht diese Beeinträchtigung der basalen Repression mit einer verminderten Aktivierung durch den Agonisten einher. Auffällig ist darüber hinaus eine Verstärkung der Repression durch den inversen Agonisten in den Mutanten K421A, K421A-K422A und T427I (schwächer auch R314A, unterhalb des Cutoffs), bei denen ein nahezu vollständiger Verlust der basalen Repression zu beobachten ist.

4.6 Charakterisierung von PPAR β/δ Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression

4.6.1 Auswirkungen auf die transkriptionelle Regulation von *ANGPTL4*

Im funktionellen Screen von PPAR β/δ -Mutanten konnten einige Mutationen identifiziert werden, die zu einer Beeinträchtigung der Repression durch den inversen Agonisten führten. Anhand dieser Mutanten konnten Rückschlüsse über die Bindung des inversen Agonisten und die Interaktionsoberfläche der rekrutierten Co-Repressoren gezogen werden (Kapitel 5.5). Der Großteil dieser Mutanten zeigte einen generellen Funktionsverlust von PPAR β/δ (DNA-Bindung, Heterodimerisierung) oder es war mutmaßlich die Bindung von Liganden oder Co-Regulatoren beider Regulationstypen betroffen. Mittels ChIP-qPCR könnte in letzteren überprüft werden, ob die Co-Repressor Kandidaten der Vorraussage entsprechend nicht mehr rekrutiert werden. Darüber hinaus sind diese Mutanten für weitere Untersuchungen allerdings ungeeignet, da sie nicht mehr oder nur noch schwach durch den inversen PPAR β/δ Agonisten reguliert werden.

Von besonderem Wert für weitere Experimente sind hingegen die Mutanten, die einen Verlust der basalen Repression zeigen, während die Liganden-vermittelte Regulation unbeeinträchtigt bleibt. In den Mutanten R314A, K421A-K422A und T427I (und K421A) führt der Verlust der basalen Repression zu einem erhöhten Basallevel der *ANGPTL4* Transkription. Diese wird von einer Erhöhung des Repressionsfaktors durch den inversen Agonisten und einem verminderten Aktivierungsfaktor durch den Agonisten begleitet. Abbildung 41 zeigt mehrere biologische Replikate der Behandlung dieser Mutanten mit den PPAR β/δ -Liganden L165,041 und PT-S264 sowie dem Zytokin TGF β_1 . Zum Vergleich sind die im Screen als Referenz verwendeten Replikate von Zellen, die mit PPAR β/δ Wildtyp (WT) rekonstituiert wurden, gezeigt. Der Repressionsfaktor durch den inversen Agonisten ist in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression signifikant höher als in den mit PPAR β/δ Wildtyp rekonstituierten Zellen. Bei der Kombinationsbehandlung mit TGF β_1 und PT-S264 deutet sich in den Mutanten T427I und R314A zwar auch ein höherer Repressionsfaktor an, der Unterschied zum Wildtyp ist hier jedoch angesichts der Anzahl der Replikate und der Standardabweichungen nicht signifikant. Die Mutanten binden weiterhin an DNA (Anhang, Abb. Z5).

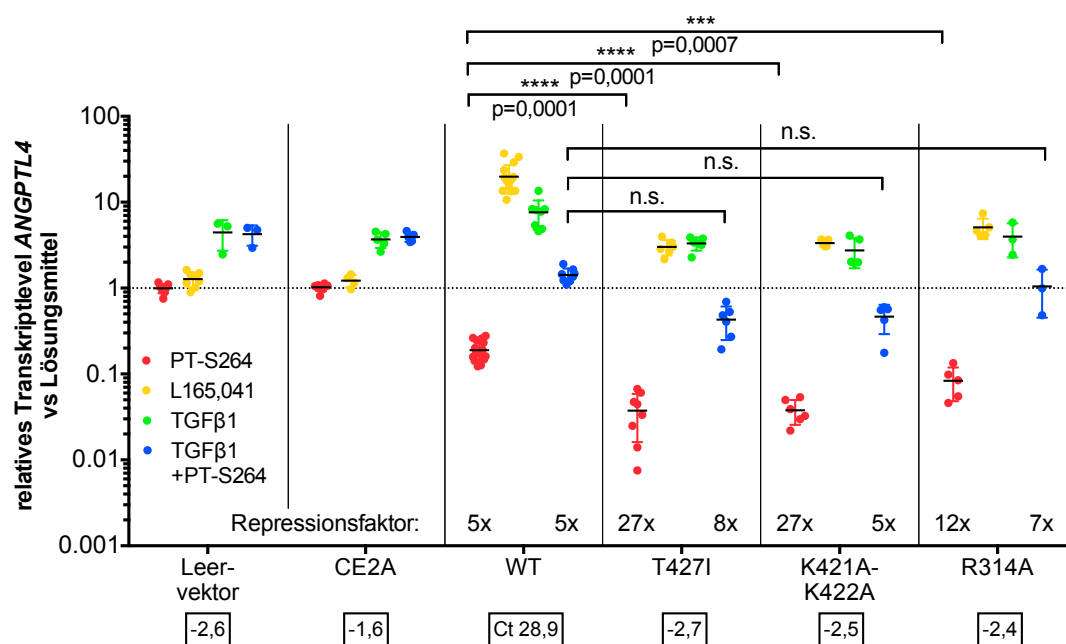


Abbildung 41: RT-qPCR, Auswirkungen der Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression auf die transkriptionelle Regulation von *ANGPTL4*. MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO *ecoR* Zellen wurden mit dem Leervektor pMSCVbsd oder mit Retroviren transduziert, die die *PPARD* DNA-Bindungs-mutante CE2A (C91A-E92A), *PPARD* Wildtyp oder die Mutanten T427I, K421A-K422A oder R314A tragen. Es wurden je 2×10^5 Zellen auf 6-wells ausgesät und am nächsten Tag für sechs Stunden mit den angegebenen Substanzen behandelt (300 nM PT-S264, 1 μ M L165,041, 1 ng/ml TGFβ₁). Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und das relative Transkriptlevel von *ANGPTL4* (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle) mittels RT-qPCR gemessen. Unterhalb der Namen der Zelllinien ist der normalisierte basale Ct-Wert der Lösungsmittelkontrollen (bei WT) bzw. die Differenz zum Wildtyp angegeben. Jeder Datenpunkt zeigt ein biologisches Replikate, jeweils errechnet aus drei technischen Replikaten. n.s. = nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ signifikanter Unterschied (t-Test) der Repressionsfaktoren (PT-S264 vs Lösungsmittel bzw. TGFβ₁ + PT-S264) zwischen 2B3 WT und der jeweiligen Mutante.

4.6.2 Auswirkungen auf die Rekrutierung von Co-Repressoren

Der Verlust der basalen Repression kann in den im vorherigen Kapitel besprochenen Mutanten vollständig durch den inversen Agonisten PT-S264 kompensiert werden, was in einem erhöhten Repressionsfaktor resultiert. Umgekehrt limitierte eine verstärkte basale Repression im funktionellen Screen in der Regel die Repression durch den inversen Agonisten. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieselben Co-Repressoren sowohl die basale Repression als auch die verstärkte Repression durch den inversen Agonisten vermitteln. Die ChIP-MS Daten zeigten eine spezifische Interaktion von PPAR β/δ mit NCoR/SMRT-Komplexkomponenten bei Gabe des inversen Agonisten (Kapitel 4.3.1). Weiterhin konnte in ChIP-Experimenten eine verstärkte Rekrutierung von Komponenten der NCoR/SMRT-Komplexe in Anwesenheit des inversen Agonisten festgestellt werden (Kapitel 4.3.2). Anhand dieser Daten erscheint es naheliegend, dass die transkriptionelle Repression durch PPAR β/δ sowohl im unligierten Zustand als auch bei Bindung des inversen Agonisten von NCoR bzw. NCoR und SMRT vermittelt wird.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte mittels ChIP-qPCR untersucht werden, ob die Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression der Voraussage entsprechende Unterschiede in der Bindung von NCoR und SMRT zeigen. Die stabil mit dem ecotropen Rezeptor Slc7a1 transfizierten MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen wurden mit Retroviren transduziert, die den Leervektor pMSCVbsd oder PPAR β/δ Wildtyp oder die Mutanten T427I, K421A-K422A oder R314A trugen. Nach einer 30-minütigen Behandlung mit dem inversen PPAR β/δ -Agonisten PT-S264, dem Agonisten L165,041 oder dem Lösungsmittel DMSO wurde eine ChIP mit Antikörpern gegen NCoR und SMRT durchgeführt. Anschließend wurde die Anreicherung der *ANGPTL4*, *PDK4* und *PLIN2* PPRES in einer qPCR gemessen. Wie aus Abbildung 42 hervorgeht, führt die Behandlung mit dem Agonisten L165,041 jeweils zu einem Verlust der Anreicherung von NCoR und SMRT. In den mit dem Leervektor transduzierten Zellen wird ebenfalls keine Bindung von NCoR und SMRT an den PPRES der betrachteten Zielgene detektiert. In den mit PPAR β/δ Wildtyp rekonstituierten Zellen sind NCoR und SMRT im Basalzustand an den PPRES anwesend. Die Behandlung mit dem inversen Agonisten führt zu einer verstärkten Rekrutierung der Co-Repressoren, die für NCoR allerdings schwächer ausfällt. In den drei Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression ist die Bindung von NCoR und SMRT im Vergleich zum Wildtyp im Basalzustand deutlich verringert. Durch die Gabe des inversen Agonisten kann die Rekrutierung der Co-Repressoren jedoch wieder auf ein vergleichbares Maß wie im Wildtyp gesteigert werden.

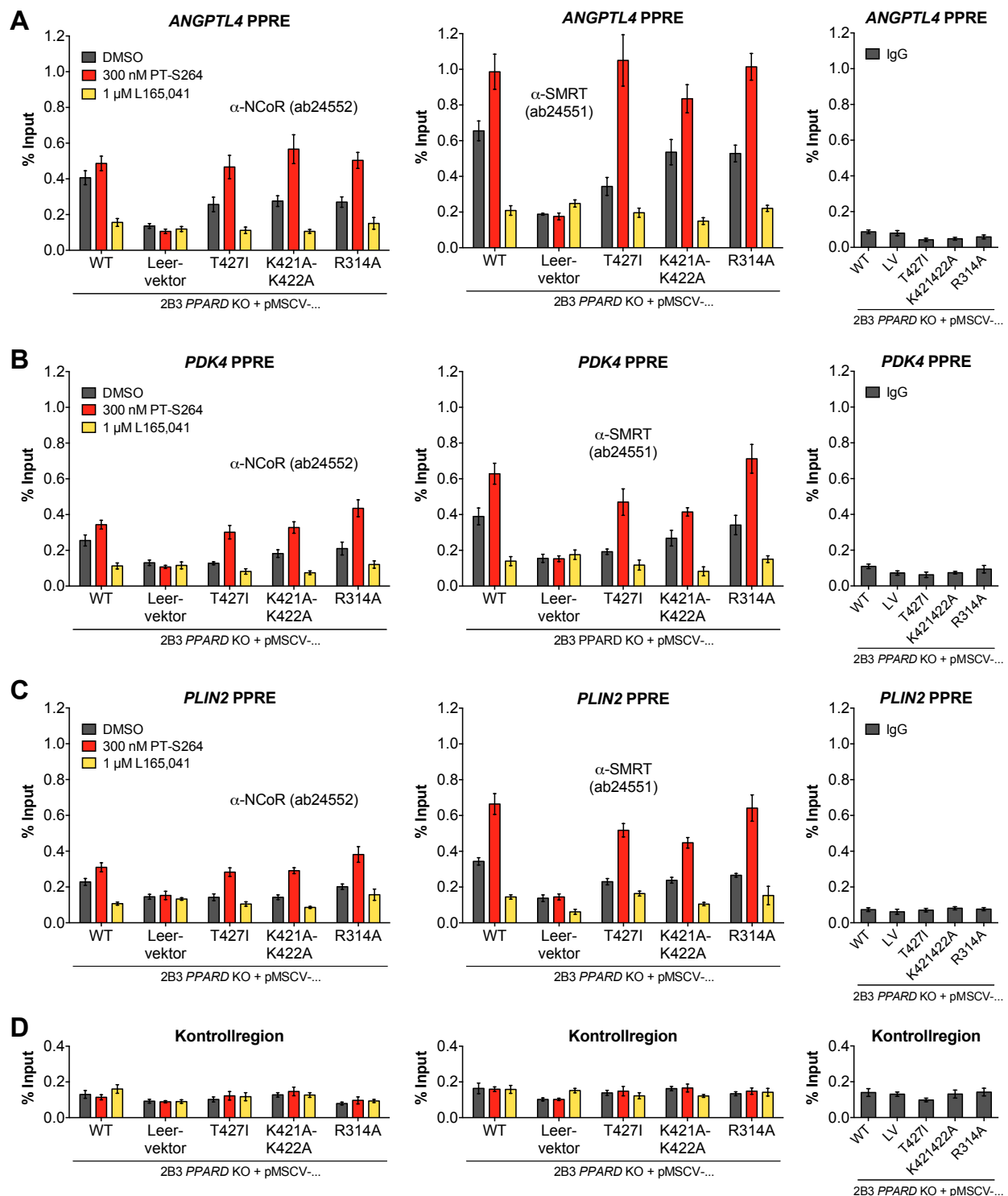


Abbildung 42: ChIP-qPCR, Rekrutierung von NCoR und SMRT in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression. MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transduziert und für 30 Minuten mit 300 nM PT-S264, 1 μ M L165,041 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Anschließend wurde eine ChIP mit Antikörpern gegen NCoR und SMRT durchgeführt und die Anreicherung der *ANGPTL4* (A), *PDK4* (B) und *PLIN2* (C) PPRES bzw. einer Kontrollregion (D) in einer qPCR gemessen. Links sind jeweils die parallel durchgeführten ChIPs mit einem unspezifischen IgG-Pool gezeigt (Chromatin-Mix aus den drei Behandlungen). Daten aus einem repräsentativen Experiment.

In einem anderen ChIP-qPCR Experiment wurde zuvor die Rekrutierung der NCoR/SMRT-Komplexkomponente HDAC3 in den Mutanten T427I und R314A untersucht (K421A-K422A lag zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor). Die Zellen wurden in diesem Experiment mit 300 nM PT-S264 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Anschließend wurde eine ChIP mit einem Antikörper gegen HDAC3 und als Kontrolle mit einem unspezifischen IgG-Pool durchgeführt. Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, ergibt sich für die HDAC3-Rekrutierung ein vergleichbares Muster wie für die Rekrutierung von NCoR und SMRT. Beim Wildtyp ist bereits im Basalzustand HDAC3 an den PPRES anwesend. Eine verstärkte Rekrutierung durch den inversen Agonisten ist in den Wildtyp-rekonstituierten Zellen für HDAC3 im Gegensatz zu den Beobachtungen für NCoR und SMRT im gezeigten Experiment nicht zu erkennen. In den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression ist die Bindung von HDAC3 basal verringert und kann ähnlich wie bei NCoR und SMRT durch den inversen Agonisten wieder auf das Niveau des Wildtyps angehoben werden.

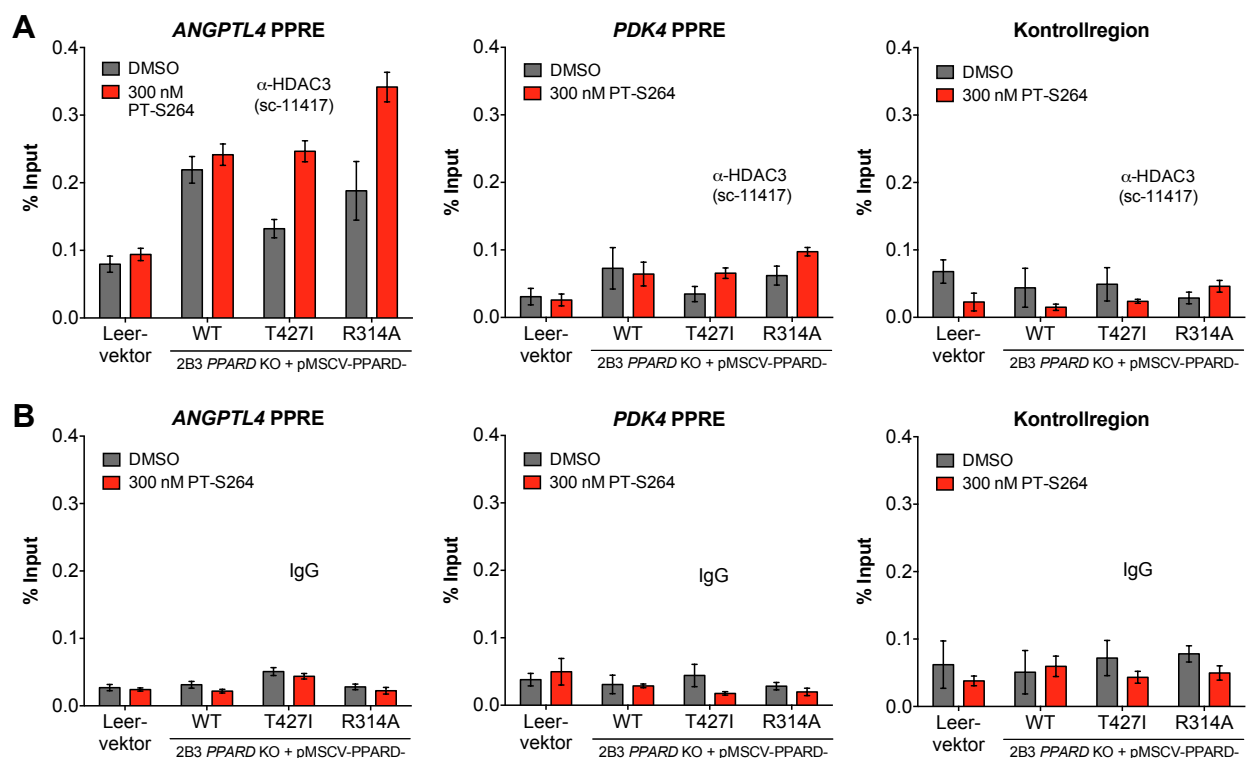


Abbildung 43: ChIP-qPCR, Rekrutierung von HDAC3 in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression. MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transduziert und für 30 Minuten mit 300 nM PT-S264 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Es wurde eine ChIP mit einem Antikörper gegen HDAC3 oder einem unspezifischen IgG-Pool durchgeführt. Die Anreicherung der *ANGPTL4* und *PDK4* PPRES sowie einer Kontrollregion wurde mittels qPCR gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

4.6.3 Auswirkungen auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II

Im vorherigen Kapitel wurde für die Mutanten ohne basale Repression ein Verlust der Bindung von Co-Repressoren im Basalzustand gezeigt. Mittels ChIP-qPCR sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob hierdurch im Basalzustand eine verstärkte Rekrutierung der RNA-Polymerase zugelassen wird. Weiterhin sollten die Auswirkungen der Wiederherstellung der Rekrutierung von Co-Repressoren durch den inversen PPAR β/δ Agonisten untersucht werden.

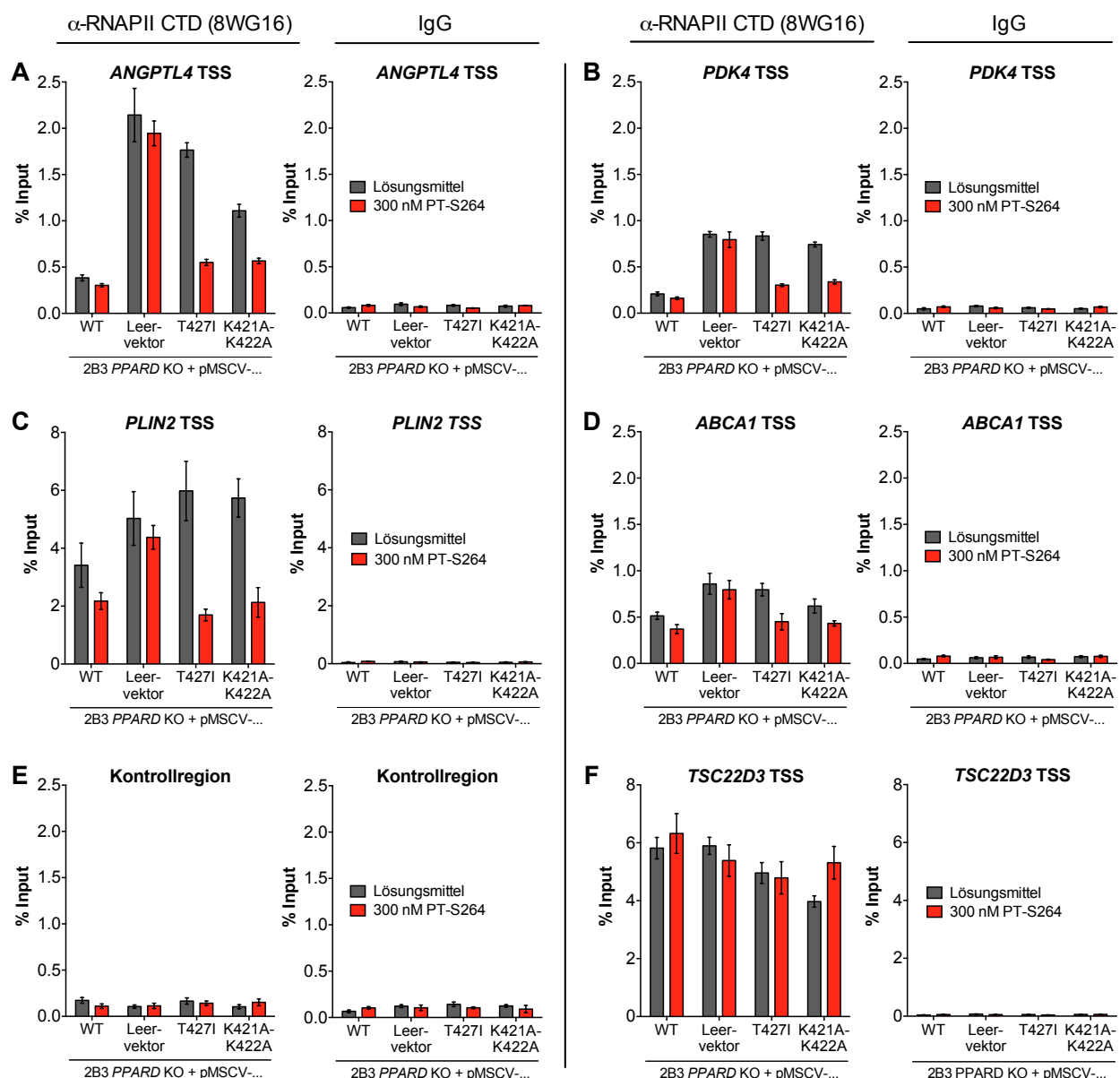


Abbildung 44: ChIP-qPCR, Rekrutierung der RNA-Polymerase II in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression. MDA-MB231-*luc2* 2B3 PPAR δ KO Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transduziert und für 30 Minuten mit 300 nM PT-S264 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Anschließend wurde eine ChIP mit einem RNA-Polymerase II (RPB1) CTD Antikörper bzw. einem unspezifischen IgG-Pool durchgeführt. Repräsentatives Experiment.

Die Herstellung der Mutanten erfolgte wie im vorherigen Kapitel. Nach einer 30-minütigen Behandlung mit 300 nM PT-S264 oder dem Lösungsmittel DMSO wurde eine ChIP mit einem RNA-Polymerase II (RPB) CTD Antikörper bzw. einem unspezifischen IgG-Pool durchgeführt. Die Anreicherung der Transkriptionsstarts von vier PPAR-Zielgenen, einer Kontrollregion und des Transkriptionsstarts von *TSC22D3* (kein PPAR-Zielgen) wurde in einer qPCR gemessen. Aus Abbildung 44 (vorherige Seite) geht hervor, dass in den Mutanten ohne basale Repression im Basalzustand eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Anreicherung der TSS von PPAR-Zielgenen in der Pol II CTD ChIP messbar ist. In Anwesenheit des inversen Agonisten wird die Rekrutierung der Polymerase deutlich vermindert und sinkt fast auf das Niveau des Wildtyps. Die Bindung der RNA-Polymerase II am Transkriptionsstart von *TSC22D3* (kein PPAR-Zielgen) wird weder durch die Expression der für PPAR β/δ kodierenden cDNAs noch durch PT-S264 beeinflusst. In den mit dem Leervektor transduzierten Zellen zeigt sich an den PPAR-Zielgenen kein Einfluss von PT-S264.

4.7 Überprüfung der Abhängigkeit von der Deacetylase-Aktivität

NCoR/SMRT-Komplexe tragen die katalytische Untereinheit HDAC3 (Kapitel 1.3.2), für die in Kapitel 4.3.2 (MDA-MB231-*luc2*) und Kapitel 4.6.2 (MDA-MB231-*luc2* 2B3 Mutanten) eine Rekrutierung in Anwesenheit des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 gezeigt wurde. Durch den Einsatz von Deacetylase-Inhibitoren sollte daher überprüft werden, ob die Deacetylase-Aktivität von HDAC3 für die transkriptionelle Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten erforderlich ist. Trichostatin A (TSA) inhibiert HDACs der Klassen I und II, während Apicidin ein HDAC3-selektiver Inhibitor ist. Die Parentalzelllinie MDA-MB231-*luc2* und der aus ihnen generierte 2B3 *PPARD* KO Klon wurden für sechs Stunden mit 500 nM Trichostatin A bzw. 250 nM Apicidin einzeln oder in Anwesenheit von 300 nM PT-S264 behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und für RT-qPCRs eingesetzt. Das Transkriptlevel der PPAR β/δ -Zielgene *ANGPTL4*, *PDK4* und *PLIN2* sowie des Nicht-Zielgens *TSC22D3* wurde gemessen (Abbildung 45).

Die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren TSA und Apicidin führt in den MDA-MB231-*luc2* zu einem Anstieg des Transkriptlevels der betrachteten Gene. In den 2B3 *PPARD* KO Zellen ist das basale Transkriptlevel von *ANGPTL4* und *PDK4* (etwas schwächer) erhöht. Insbesondere bei *ANGPTL4* fällt der Anstieg des Transkriptlevels durch die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren schwächer aus als in den Parentalzellen. Die transkriptionelle Repression von *ANGPTL4* durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 wird weder durch TSA noch durch Apicidin vollständig aufgehoben. Jedoch führen die HDAC-Inhibitoren zu einer gewissen Abschwächung des repressiven Effekts (21,9x auf 4,4x bzw. 9,5x). Für die Zielgene *PDK4* und

PLIN2, bei denen die Repression generell schwächer ausgeprägt ist, zeigt sich ein ähnliches, wenn auch abgeschwächtes Muster. Das Transkriptlevel von *TSC22D3*, welches kein PPAR-Zielgen ist, steigt zwar durch die Inhibition der Deacetylase-Aktivität an, bleibt jedoch von PT-S264 unbeeinflusst. Auch die 2B3 *PPARD* KO reagieren erwartungsgemäß nicht auf den inversen PPAR β/δ Agonisten.

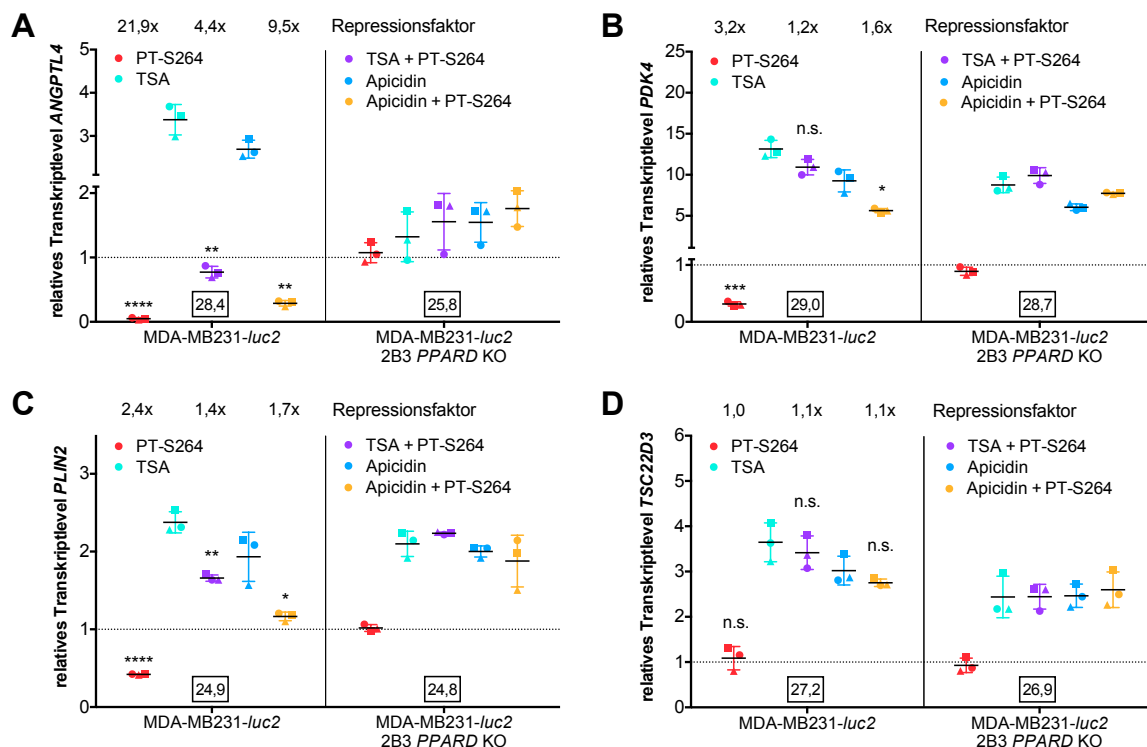


Abbildung 45: RT-qPCR, Sensitivität der PT-S264 vermittelten Repression gegenüber HDAC-Inhibitoren, MDA-MB231-luc2 und 2B3 *PPARD* KO. MDA-MB231-luc2 und 2B3 *PPARD* KO Zellen wurden sechs Stunden mit 500 nM TSA bzw. 250 nM Apicidin einzeln oder in Kombination mit 300 nM PT-S264 behandelt. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und in RT-qPCRs wurde das relative Transkriptlevel (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle) der PPAR-Zielgene *ANGPTL4* (A), *PDK4* (B) und *PLIN2* (C) sowie des Nicht-Zielgens *TSC22D3* (D) gemessen. Der normalisierte basale Ct-Wert der Lösungsmittelkontrolle ist oberhalb der x-Achse angegeben. Jeder Datenpunkt zeigt ein biologisches Replikate, jeweils errechnet aus drei technischen Replikaten. n.s. = nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ signifikanter Unterschied (t-Test) der Repressionsfaktoren (jeweilige Behandlung ohne PT-S264 vs mit PT-S264).

Nach dem gleichen Muster wurden in einem weiteren Experiment MDA-MB231-luc2 2B3 *PPARD* KO Zellen nach der Transduktion mit PPAR β/δ Wildtyp oder den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression behandelt (Abbildung 46). In den mit PPAR β/δ Wildtyp transduzierten Zellen steigt das *ANGPTL4* Transkriptlevel durch die Inhibition der Deacetylase-Aktivität an. Dieser Anstieg des Transkriptlevels ist in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression (bis auf eine Ausnahme) nicht zu beobachten. Die Repression durch den inversen

PPAR β/δ Agonisten PT-S264 ist in den mit PPAR β/δ Wildtyp rekonstituierten Zellen nur in geringem Ausmaß sensitiv gegenüber den HDAC-Inhibitoren. In den Mutanten ohne basale Repression wird die Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten in Anwesenheit der HDAC-Inhibitoren deutlicher geschwächt. *PDK4* zeigt ein ähnliches Muster, jedoch schwächer ausgeprägt.

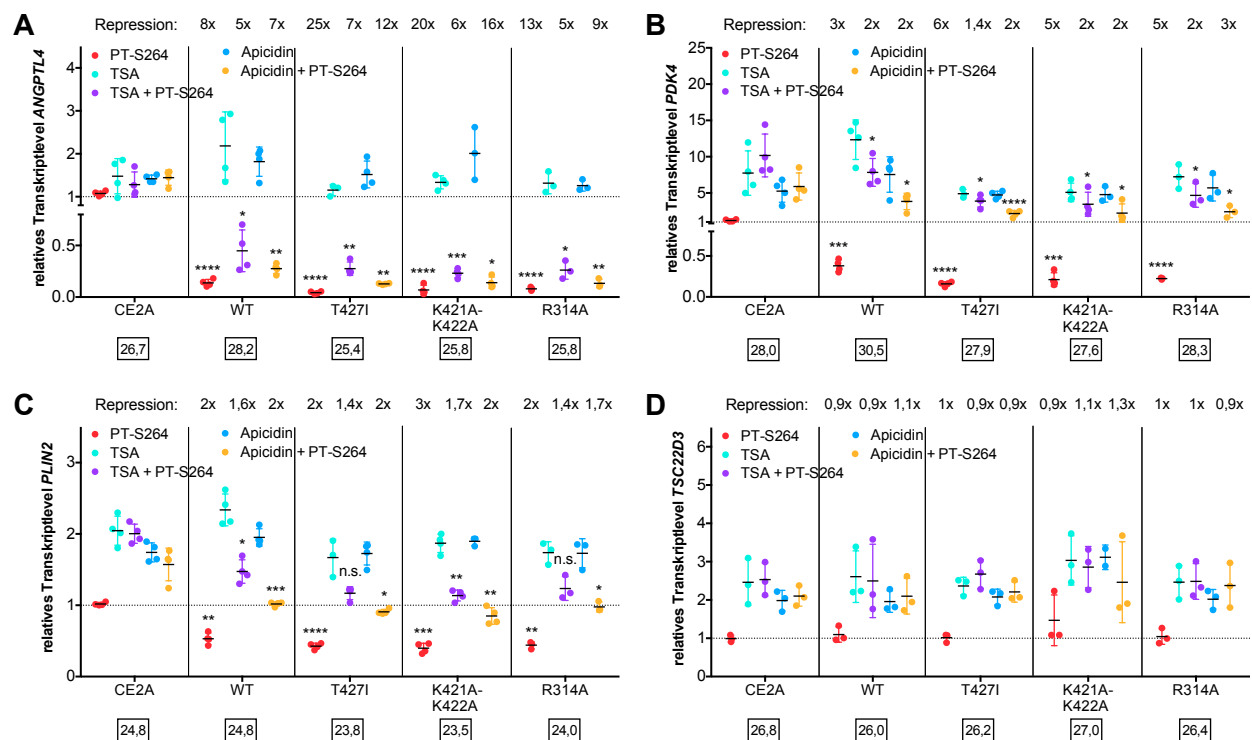


Abbildung 46: RT-qPCR, Sensitivität der PT-S264 vermittelten Repression gegenüber HDAC-Inhibitoren, MDA-MB231-luc2 2B3 *PPARD* KO transduziert mit PPAR β/δ cDNAs. MDA-MB231-luc2 2B3 *PPARD* KO Zellen, transduziert mit den angegebenen PPAR β/δ cDNAs, wurden sechs Stunden mit 500 nM TSA bzw. 250 nM Apicidin einzeln oder in Kombination mit 300 nM PT-S264 behandelt. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und in RT-qPCRs wurde das relative Transkriptlevel (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle) der PPAR-Zielgene *ANGPTL4* (A), *PDK4* (B) und *PLIN2* (C) sowie des Nicht-Zielgens *TSC22D3* (D) gemessen. Der normalisierte basale Ct-Wert der Lösungsmittelkontrolle ist unterhalb der Mutanten-Bezeichnung angegeben. Jeder Datenpunkt zeigt ein biologisches Replikat, jeweils errechnet aus drei technischen Replikaten. n.s. = nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ signifikanter Unterschied (t-Test) der Repressionsfaktoren (jeweilige Behandlung ohne PT-S264 vs mit PT-S264).

4.8 Ansätze zum Nachweis eines funktionellen Zusammenhangs mit NCoR/SMRT-Komplexen

In den vorherigen Kapiteln konnte eine Korrelation der transkriptionellen Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten mit der Rekrutierung von NCoR/SMRT-Komplexkomponenten gezeigt werden. Um einen tatsächlichen funktionellen Zusammenhang nachzuweisen, wurden die nachfolgend beschriebenen Ansätze verfolgt.

Die Daten aus Kapitel 4.7 legen nahe, dass die transkriptionelle Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten zum Teil über einen Deacetylase-unabhängigen Mechanismus abläuft. In der Literatur finden sich mehrere Hinweise auf Deacetylase-unabhängige Funktionen von HDAC3 und NCoR/SMRT-Komplexen. Sun *et al.* beobachteten 2013 ^[267], dass enzymatisch defektes Hdac3 die Hdac3-abhängige transkriptionelle Repression aufrecht erhalten kann, obwohl die genomweite Histonacetylierung nicht unterbunden wird. Der Verlust der Interaktion mit Ncor/Smrt führte hingegen zu einem vollen Funktionsverlust von Hdac3 *in vivo*. You *et al.* untersuchten 2013 ^[312] eine DAD-Domänen-Mutante von Ncor und Smrt, die zur Folge hatte, dass Hdac3 enzymatisch inaktiv ist. Mäuse, die diese Mutante exprimierten, konnten sich bis ins Erwachsenenalter entwickeln, während eine genetische Deletion von Hdac3 embryonal lethal verläuft. Der mit NCoR und SMRT interagierende Transkriptionsfaktor MeCP2 (*Methylated CpG binding Protein 2*) ^[168] reprimiert die Transkription durch einen HDAC-unabhängigen Mechanismus ^[314]. Koerner *et al.* beobachteten 2018 ^[143], dass die lethalen Auswirkungen einer verstärkten Mecp2-Expression in Mäusen zwar abhängig sind von der Interaktion mit Ncor bzw. Smrt, nicht aber von der enzymatischen Aktivität von Hdac3.

4.8.1 CRISPR/Cas9-vermittelter *Knockout* von *NCOR1*

Mittels CRISPR/Cas9 sollte in MDA-MB231-*luc2* Zellen ein *Knockout* von *NCOR1* generiert werden. Dabei kam ein Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) basiertes System zum Einsatz. Das genaue experimentelle Vorgehen kann Kapitel 3.5.1 entnommen werden. Die Sequenzen der target-spezifischen crRNAs sind in Kapitel 2.4.4 aufgeführt.

Bevor die RNP-Komplexe in die Zellen eingebracht wurden, wurden sie in einem *in vitro* RNP-Test (Kapitel 3.5.1) auf die Funktionalität der Cas9 Nuklease mit den eingesetzten crRNAs überprüft. Wie Abbildung 47A zeigt, konnte das zuvor mittels PCR amplifizierte *NCOR1* DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 900 bp im *in vitro* Test von den RNP-Komplexen mit jeder der eingesetzten *NCOR1* crRNAs (1, 2 und 4) geschnitten werden. Da die Erkennungssequenzen der crRNAs überlappen, entstehen in jedem der drei Tests zwei Fragmente mit

einer Größe von ca. 350 bp und 550 bp. Der RNP-Komplex mit der crRNA4 hat etwas mehr DNA geschnitten als die anderen beiden. Durch die Verwendung einer ATTO™ 550 gelabelten tracrRNA konnte die Aufnahme der RNP-Komplexe in die Zellen am Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Wie aus Abbildung 47C hervorgeht, wird nach der Transfektion der RNP-Komplexe in ca. 90 % der Zellen ein rotes Fluoreszenzsignal detektiert.

Insgesamt wurden über mehrere Monate hinweg drei *NCOR1* CRISPR/Cas9 KO Durchläufe in MDA-MB231-*luc2* Zellen durchgeführt. Bei jedem Durchlauf wurden die Zellen letztlich pro crRNA bzw. für den crRNA-Pool auf je ein bis zwei 96-*well* Platten vereinzelt. Im Verlauf der Kultivierung und Expansion der Einzelklone wurde stets eine hohe Verlustrate beobachtet. Anfänglich starben pro Passage jeweils ca. 40 % der zunächst entwickelten und teils auch nach dem Umsetzen zunächst adhärierten Klone. Nach dem Erreichen größerer *well*-Formate ging die Verlustrate auf 20 % und schließlich auf 10 % zurück. Von 116 Klonen, die im dritten Durchlauf das 48-*well* Format erreichten, konnten somit letztlich nur 55 Klone bis zum 6-*well* Format expandiert und im Western Blot getestet werden. Aus allen drei Ansätzen wurden insgesamt ca. 90 Klone auf einen *Knockout* von NCoR1 überprüft. Bei jedem dieser getesteten Klone wurde im Western Blot eine Expression von NCoR1 auf Proteinebene detektiert. Abbildung 47B zeigt beispielhaft einen repräsentativen Western Blot.

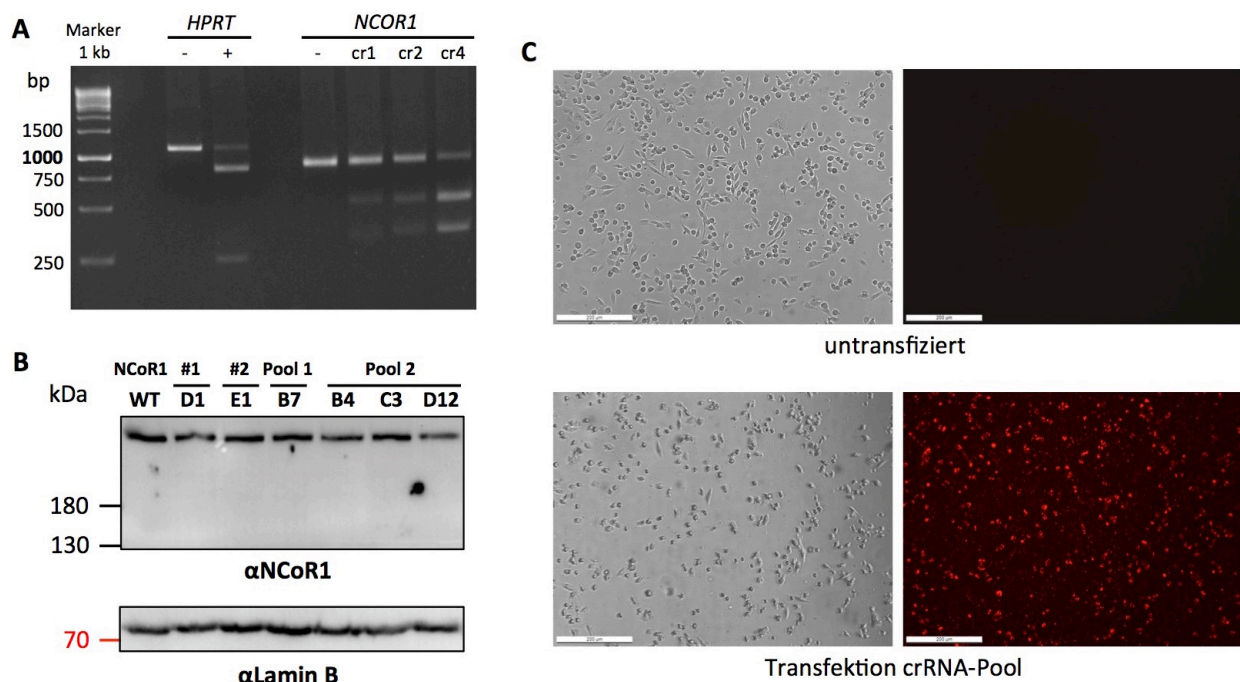


Abbildung 47: CRISPR/Cas9 zur Generierung eines *NCOR1* Knockout. A) Agarose-Gel des *in vitro* RNP-Tests. Ein PCR-amplifiziertes Fragment des *NCOR1* Gens wurde mit RNP-Komplexen inkubiert, die die Cas9 Nuklease und eine crRNA:tracrRNA Duplex enthielten. Bei der Negativkontrolle (-) wurde kein RNP-Komplex zugegeben. *HPRT* war eine Positivkontrolle aus dem verwendeten Kit. B) Repräsentativer Western Blot von Einzelklonen des *NCOR1* CRISPR/Cas9 KO Ansatzes zur Überprüfung des NCoR1 *Knockouts*. C) Fluoreszenzmikroskopie, MDA-MB231-*luc2* Zellen untransfiziert (links) und nach Transfektion von RNP-Komplexen mit einem Pool aus drei crRNAs (rechts), ATTO™ 550 gelabelte tracrRNA.

4.8.2 Expression eines dominant-negativen NCoR-Fragments (dnNCoR)

Dreer *et al.* untersuchten 2016 ^[65] Deacetylase-unabhängige, aber NCoR-abhängige Effekte in der Virusreplikation und -transkription. Sie exprimierten ein dominant-negatives NCoR1 Fragment (Aminosäuren 1-304) und konnten zeigen, dass es die transkriptionelle Repression verhindert. Diesem Prinzip folgend sollte ein dominant-negatives NCoR1 Fragment (Klonierung siehe Kapitel 3.1.1.2) in MDA-MB231-*luc2* exprimiert werden, um zu überprüfen, ob dadurch die transkriptionelle Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten unterbunden werden kann. Das eingesetzte dominant-negative Fragment (dnNCoR1) besteht aus einem N-terminalen FLAG-Tag, einer NLS und den ersten 304 Aminosäuren von NCoR1. Diese enthalten die Bindungsstellen für die Komplexkomponenten TBL1 und GPS2 (Kapitel 1.3.2). Durch die Bindung der Interaktionspartner TBL1 und GPS2 an dnNCoR1 sollte ein Komplex entstehen, der aufgrund des Fehlens der Rezeptorinteraktionsdomänen nicht mehr an PPAR β/δ binden kann. Somit würden Co-Repressoren sequestriert werden und könnten nicht mehr an die PPRES von PPAR-Zielgenen rekrutiert werden.

Das dnNCoR1-Fragment wurde in mehrere Vektoren kloniert (Kapitel 3.1.1.2), um unterschiedliche Expressionslevel zu ermöglichen. Die retroviralen Vektoren pMSCVbsd, pMSCVhyg und pBABEhyg wurden in MDA-MB231-*luc2* Zellen transduziert, die den murinen ecotropen Rezeptor Slc7a1 exprimieren. Der CMV-getriebene Vektor pcDNA3.1 wurde in MDA-MB231-*luc2* Zellen transfiziert. Nach dem Abschluss der Selektion mit den jeweiligen Selektionsantibiotika (10 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidin, 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 oder 90-120 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin) wurden die Zellen mit PPAR β/δ -Liganden und TGF β_1 behandelt und eine RT-qPCR durchgeführt. Wie in Abbildung 48A-D ersichtlich wird, ist in den MDA-MB231-*luc2* Zellen keine Beeinträchtigung der PT-S264 vermittelten transkriptionellen Repression von *ANGPTL4* zu beobachten. Mittels Western Blot wurde parallel die Expression des dnNCoR1-Fragments in den MDA-MB231-*luc2* Zellen (Abbildung 48E) und nach einer transienten Transfektion in HEK293 Zellen (Abbildung 48F) überprüft. In den MDA-MB231-*luc2* Zellen konnte mit keinem der Vektoren eine Expression des dnNCoR1-Fragments erzielt werden. Nach der transienten Transfektion wird nur beim Vektor mit dem stärksten Promotor pcDNA3.1-dnNCoR1 eine sehr schwache Expression detektiert.

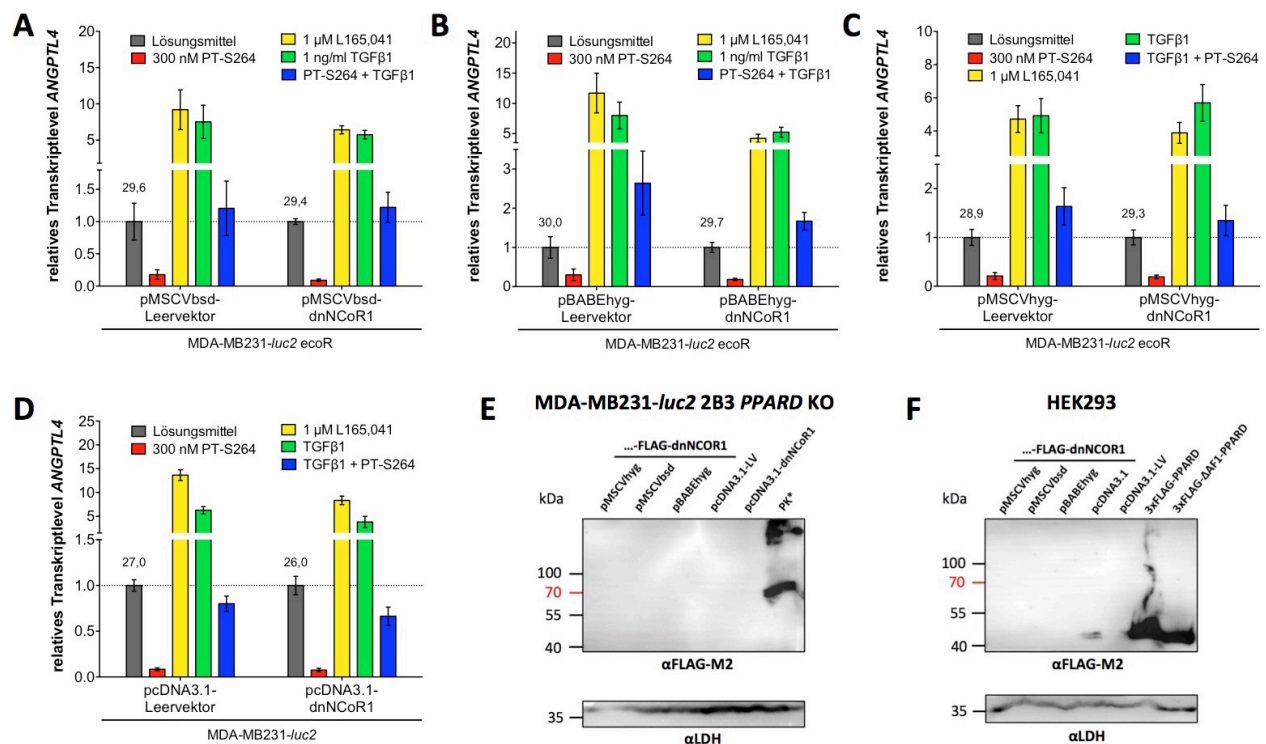


Abbildung 48: Versuch der Expression eines dominant-negativen NCoR1-Fragments. A)-D) MDA-MB231-luc2 Zellen, die stabil den murinen ecotropen Rezeptor Slc7a1 exprimieren (A-C), wurden mit den angegebenen Vektoren transduziert. Nach Ablauf der Selektion wurden die Zellen sechs Stunden mit PPARβ/δ-Liganden bzw. TGFβ₁ behandelt und eine RT-qPCR durchgeführt. E) Western Blot zur Überprüfung der Expression des dnNCoR1-Fragments in den MDA-MB231-luc2 Zellen aus A-D. PK* = Positivkontrolle für den FLAG-Antikörper. F) Western Blot zur Überprüfung der Expression des dnNCoR1-Fragments nach der transienten Transfektion von HEK293 Zellen. 3xFLAG-PPARδ und -ΔAF1-PPARδ liegen im pMSCVbsd-Vektor vor und dienen als Kontrolle.

4.8.3 Expression von PPARβ/δ-NCoR/SMRT Fusionsproteinen

Wie aus der Literatur bekannt ist, können unterschiedliche SANT-Domänen verschiedene Enzymaktivitäten regulieren. Bereits in Kapitel 1.3.1 wurde erläutert, dass die SANT1 (DAD) Domäne von SMRT und NCoR die enzymatische Aktivität von HDAC3 aktiviert ^[93]. Weiterhin kann die SANT2 (HID) Domäne von SMRT die Aktivität von HATs inhibieren, indem sie an Histone bindet und diese so gegenüber HATs abschirmt ^[315]. Boyer *et al.* zeigten 2002 ^[35], dass die SANT-Domäne von ADA2 die HAT-Aktivität von GCN5 aktiviert. Für die SANT-Domäne der p400 ATPase wurde hingegen von Park *et al.* 2010 ^[221] eine inhibitorische Wirkung auf die HAT-Aktivität von TIP60 beschrieben. Cowger und Torchia konnten 2006 ^[55] zeigen, dass ein N-terminales Fragment von NCoR1 an CBP bindet und dessen HAT-Aktivität inhibiert.

Hypothese

Wie Barrios *et al.* 2014 ^[21] beobachteten, kann der REST Co-Repressor 2 (RCoR2) im Gegensatz zu den nah verwandten Repressoren RCoR1 und RCoR3 HDAC-unabhängig reprimieren. Bei Betrachtung der SANT-Domänen fällt auf, dass RCoR2 abweichend von RCoR1 und RCoR3 ein Prolin im Bereich der dritten Helix trägt (Abbildung 49). Dieses Prolin könnte zu einer Unterbrechung der Helix führen und für die besondere HDAC-unabhängige Repressionsfunktion von RCoR2 verantwortlich sein. Wie in einem Sequenzalignment erkennbar wird, enthält eine SANT-Domäne von NCoR im Gegensatz zur SANT-Domäne von SMRT ebenfalls ein Prolin an der entsprechenden Position (Abbildung 49). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass die HDAC-unabhängige Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten nur von NCoR vermittelt werden kann, während SMRT diese Funktion fehlt.

RCoRs:	
RCOR3-203	*** NFT-----PFPDEWTVEDKVLFEQAFSFGKSFHRIQQMLPDKTASLVKYYYSWKK
RCOR3-202	NFT-----PFPDEWTVEDKVLFEQAFSFGKSFHRIQQMLPDKTASLVKYYYSWKK
RCOR1-201	NFT-----PFPDEWTVEDKVLFEQAFSFGKTFHRIQQMLPDKSIASLVKFYYYSWKK
RCOR2-201	NFT-----PFPDEWTVEDKVLFEQAFGFGKCFQRIQQMLPDKLP P SLVKYYYSWKK
NCoRs:	
(SMRT) NCOR2-208	***** NMNGLMADPMKVYKDRQVMNWSEQEKETFREKFMQHPKNFGLIASFLERKTVAECVLYYYLTCK
(NCoR) NCOR1-201	***** NMNGLMEDPMKVYKDRQFMNVWTDHEKEIFKDKFIQHPKNFGLIASYLERKSV P DCVLYYYLTCK

Abbildung 49: Sequenz-Alignment der RCoRs und NCoRs. Oben sind die Sequenzen der SANT-Domänen der RCoRs gezeigt. RCoR2 trägt abweichend von RCoR1 und RCoR3 ein Prolin (P) im Bereich der dritten putativen Helix. Beim Vergleich der SANT-Domänen von SMRT und NCoR (unten) fällt auf, dass auch NCoR abweichend von SMRT ein Prolin an der entsprechenden Stelle aufweist.

Chien *et al.* untersuchten 1999 ^[49] Fusionsproteine des Estrogen-Rezeptors (ER) mit N-terminalen Bereichen von NCoR. In Reporter-gen-Assays konnten sie zeigen, dass die chimären Proteine eine dominante Repression der Transkription ausübten, die unabhängig von Deacetylase-Aktivität war. Um die aufgestellte Hypothese *in vivo* zu überprüfen, wurden in Anlehnung an diese Studie PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionskonstrukte kloniert. Diese kodieren für die Aminosäuren 1-428 von PPAR β/δ , die über einen Linker mit den ersten 891 bzw. 911 Aminosäuren von NCoR bzw. SMRT verbunden sind (Kapitel 3.1.1.1). Kompatible Restriktionsschnittstellen innerhalb der cDNAs erlauben den Austausch einzelner Bereiche von NCoR und SMRT (Abbildung 50A). Dadurch soll ermöglicht werden, den für die Repression verantwortlichen Bereich einzugrenzen und zu untersuchen, ob sich NCoR und SMRT tatsächlich in ihrer Funktion unterscheiden. Zunächst wurden die reinen PPAR β/δ -NCoR bzw. PPAR β/δ -SMRT Konstrukte in MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen transduziert. Die Zellen wurden für sechs Stunden mit 300 nM PT-S264, dem aktivierenden Stimulus TGF β_1 oder einer Kombination beider Stoffe behandelt. Nach der Isolation und reversen Transkription der RNA wurde das relative Transkriptlevel von *ANGPTL4* in einer RT-qPCR gemessen. Die Mutation H413W

verhindert wahrscheinlich die Bindung von Liganden an PPAR β/δ (nähere Erläuterungen in Kapitel 5.5.6). Sie wurde beim PPAR β/δ -NCoR Fusionskonstrukt eingefügt, um das Fusionsprotein unabhängig von Ligandeneffekten untersuchen zu können. Wie aus Abbildung 50B hervorgeht, zeigen die mit den Fusionskonstrukten transduzierten Zellen im Vergleich zu den PPAR β/δ -Wildtyp transduzierten Zellen ein erhöhtes basales Transkriptlevel. Die Aktivierung durch TGF β_1 wird in den Zellen, die die Fusionskonstrukte exprimieren sollten, nicht konstitutiv unterdrückt und es ist keine Regulation durch PT-S264 zu beobachten. Parallel wurde mittels Western Blot die Expression der PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionsproteine in den MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen (Abbildung 50C) und nach einer transienten Transfektion in HEK293 Zellen (Abbildung 50D) überprüft. In den MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen war nur ein extrem schwaches Signal messbar, während in den HEK293 Zellen nach der transienten Transfektion deutlicher eine Expression der Fusionsproteine zu sehen ist. Die cDNAs für die Mutanten CE2A (C91A-E92A) und H413W sowie für Wildtyp PPAR β/δ werden in den transduzierten MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen deutlich exprimiert.

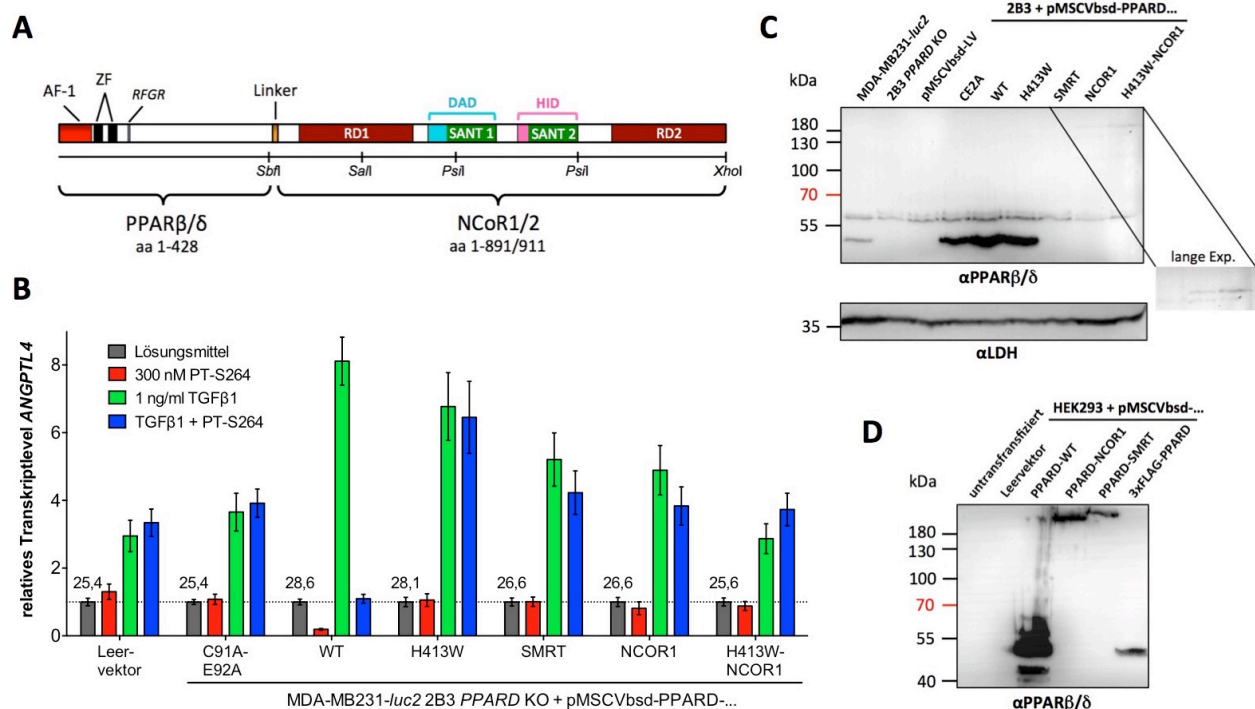


Abbildung 50: Expression von PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionskonstrukten. A) Schema zu den Fusionskonstrukten (Kapitel 3.1.1.1). B) RT-qPCR, MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen, die stabil den murinen ecotropen Rezeptor *Slc7a1* exprimieren, wurden mit den angegebenen Vektoren transduziert. Nach Ablauf der Selektion wurden die Zellen sechs Stunden mit PT-S264 bzw. TGF β_1 behandelt und eine RT-qPCR durchgeführt. WT = PPAR β/δ Wildtyp. C) Western Blot zur Überprüfung der Expression der PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionskonstrukte in den MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen. D) Western Blot zur Überprüfung der Expression der PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionskonstrukte nach der transienten Transfektion von HEK293 Zellen.

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Die Zelllinien MDA-MB231-*luc2* und Caki-1 bieten geeignete Zellsysteme für die geplanten Untersuchungen

Die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231-*luc2* zeigte einen deutlich stärkeren Effekt der PPAR β/δ -Liganden auf die *ANGPTL4* Transkription als die Nierenkarzinom-Zelllinie Caki-1. Allerdings ist die basale *ANGPTL4* Expression in MDA-MB231-*luc2* sehr viel niedriger als in Caki-1. Dieses niedrige Basallevel könnte für die Untersuchung des betroffenen Schritts des Transkriptionszyklus mittels ChIP-qPCR Experimenten problematisch sein, da weniger RNA-Polymerase II, generelle Transkriptionsfaktoren und Mediator-Untereinheiten am Locus anwesend sind (eigene Beobachtungen und persönliche Mitteilung von T. Adhikary). Trotz der schwächeren Ligandenresponsivität wird die Zelllinie Caki-1 aufgrund des höheren Basallevels für die geplanten ChIP-qPCR Experimente zu den Schritten des Transkriptionszyklus als besser geeignet angesehen.

Die starke Repression in den MDA-MB231-*luc2* Zellen ist ein Hinweis darauf, dass die für den Mechanismus erforderlichen Co-Regulatoren in dieser Zelllinie in ausreichender Menge vorhanden sind. Aufgrund dieser Beobachtungen erschien die humane Mammakarzinom-Zelllinie bereits in der eigenen Masterarbeit ^[155] als für den *Knockout* von *PPARD* am besten geeignete Zelllinie. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein unbekannter Co-Repressor bei der Rekonstitution von PPAR β/δ limitierend wird, ist in diesen Zellen am geringsten einzuschätzen. Ein entsprechender *PPARD Knockout*-Klon (2B3) konnte im weiteren Verlauf bereits in der Masterarbeit erfolgreich generiert und für die Rekonstitution mit PPAR β/δ -Mutanten eingesetzt werden ^[155]. Die hohe Ligandenresponsivität bietet eine ausreichende Signalamplitude zur Beurteilung einer Beeinträchtigung der transkriptionellen Regulation bei Expression der einzelnen PPAR β/δ -Mutanten. Dies zeigte sich in zuvor verfügbaren MCF7 *PPARD KO* Zellen problematisch, da die Regulation der *ANGPTL4* Transkription durch inverse PPAR β/δ Agonisten in MCF7 Zellen deutlich geringer ausfällt. Neben der Durchführung des funktionellen Screens von PPAR β/δ -Mutanten, bietet sich die Zelllinie MDA-MB231-*luc2* angesichts der starken Regulation durch PPAR β/δ -Liganden besonders für die geplanten Interaktom-Studien an.

5.2 Auswirkungen auf Schritte des Transkriptionszyklus

5.2.1 Der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 vermindert die Bindung der RNA-Polymerase II am Transkriptionsstart

Mittels *Scanning* ChIP-qPCR Experimenten in Caki-1 Zellen wurde mit vier verschiedenen RNA-Polymerase II Antikörpern gezeigt, dass der inverse PPAR β/δ Agonist zu einer reduzierten Bindung der Polymerase bereits am Transkriptionsstart des *ANGPTL4* Gens führt. Dieses Muster setzte sich über den gesamten Locus fort. Eine verstärkte Rekrutierung der Polymerase bei Gabe des aktivierenden Stimulus TGF β_1 konnte durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 unterbunden werden, was gut mit der gegenüber aktivierenden Stimuli dominanten Repression des Liganden vereinbar ist.

Es war auffällig, dass der durch TGF β_1 induzierte Anstieg des Signals am Transkriptionsstart beim Antikörper 1C7 schwächer ausfiel als bei den übrigen Antikörpern. In einer Publikation des D. Eick Labors ^[102], aus dem der 1C7 Antikörper stammt, wurde dessen Spezifität untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Antikörper neben der unphosphorylierten CTD auch einige modifizierte Varianten der RNA-Polymerase II RPB1 CTD-*Repeats* erkennt. Jedoch kann der Antikörper nicht an CTD-*Repeats* binden, die eine Phosphorylierung an Serin 5 aufweisen. Möglicherweise liegt ein großer Anteil der bei einer Aktivierung durch TGF β_1 am Transkriptionsstart vermehrt anwesenden RNA-Polymerase II mit einer an Serin 5 phosphorylierten CTD vor, da das Promotor-proximale Pausieren zeitlich limitierend ist. Dieser Anteil wird von den 1C7 Antikörper nicht erkannt, von den anderen drei in diesem Experiment verwendeten Antikörpern hingegen offenbar schon.

Beim Vergleich der Bindungsprofile der RNA-Polymerase II am *ANGPTL4* Locus ähnelte das Muster bei der Behandlung mit dem inversen PPAR β/δ Agonisten dem Muster, das sich mit dem Initiationsinhibitor Triptolid ergab. Die Profile der Elongationsinhibitoren DRB und Flavopiridol zeigten hingegen größere Abweichungen auf. Im Gegensatz zur PT-S264 Behandlung führten diese nicht zur Reduktion der RNA-Polymerase II Bindung bereits am Transkriptionsstart. Bei diesen Substanzen war stattdessen bei gleichbleibendem (oder sogar ansteigenden) Maximum am Transkriptionsstart ein nach stromaufwärts verbreiteter Signal-Peak mit einem steileren Abfall nach stromabwärts zu beobachten. Diese Verbreiterung könnte aus einem Stau der Polymerasen am TSS aufgrund der Beeinträchtigung der Freigabe aus der Promotor-proximalen Pause durch die Inhibition der CDK9 resultieren. Der Anstieg des Signals am PPRE im Vergleich zu den angrenzenden Regionen könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass die Enhancer-Promotor Kontakte durch die Behandlung mit DRB oder Flavopiridol nicht gestört sind. Dies steht im Einklang mit ihrem Wirkmechanismus und dem Eingreifen am Übergang zur produkti-

ven Elongation. Das erhöhte Signal könnte durch den Rückstau von Polymerasen am Promotor entstehen, der dazu führt, dass bei einer intakten Interaktion zwischen Promotor und Enhancer auch am Enhancer mehr RNA-Polymerase II detektiert wird. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass der Anteil der Polymerase, der trotz der Inhibitoren elongiert, nur verlangsamt fortschreiten und den Enhancer schlechter durchfahren kann.

Zusammenfassend ergeben sich aus den Daten deutliche Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Transkriptionsinitiation durch den inversen PPAR β/δ Agonisten, was sich in einer verringerten Rekrutierung der RNA-Polymerase II am Transkriptionsstart des *ANGPTL4* Gens widerspiegelt.

5.2.2 Die Phosphorylierung der Serine 2 und 5 der RNA-Polymerase II RPB1 CTD-*Repeats* scheint nicht beeinträchtigt zu sein

In den *Scanning* ChIP-qPCR Experimenten mit den RPB1 CTD Ser2-P bzw. Ser5-P Antikörpern zeigten sich die, anhand der Literaturlage über den Zeitpunkt ihres Auftretens innerhalb des Transkriptionszyklus, erwarteten Muster. Die Serin 5 Phosphorylierung hatte ihr Maximum am Transkriptionsstart und nahm über den Genkörper hinweg ab, während die Serin 2 Phosphorylierung am Transkriptionsstart ein Minimum aufwies und über den Genkörper anstieg. Das Muster der Behandlungen entsprach dem zuvor mit Gesamt-Pol II Antikörpern beobachteten Muster einer erhöhten Anreicherung mit TGF β_1 und einer verminderten Anreicherung mit PT-S264. Eine Problematik der verwendeten Antikörper ist die Tatsache, dass die Erkennung von phosphoryliertem Serin 2 bzw. Serin 5 durch die gleichzeitige Modifikation beider Aminosäuren innerhalb desselben CTD-*Repeats* gestört wird ^[102]. Ein solches Muster könnte möglicherweise insbesondere innerhalb des Genkörpers vorliegen, wo die Transition von Ser5-P zu Ser2-P erfolgt.

Die Interpretation der Daten wird durch die Veränderungen der Gesamtmenge der am Locus anwesenden RNA-Polymerase II erschwert. Eine Normalisierung gestaltet sich in ChIP-Experimenten aufgrund unterschiedlicher Präzipitationseffizienzen zwischen verschiedenen Antikörpern schwierig. Anhand der parallel durchgeführten ChIP-Experimente aus Abbildung 25 (jeweils zwei Antikörper gegen die CTD bzw. die NTD der RNA-Polymerase II Untereinheit RPB1) wurden mehrere Normalisierungsszenarien durchgespielt. Aufgrund der ChIP-internen Schwankungen konnte jedoch keine zufriedenstellende Normalisierung erreicht werden. Die sich ergebenden Profile weichten in Abhängigkeit von der jeweils zugrunde gelegten Referenz-ChIP stark voneinander ab.

Unter Berücksichtigung der Veränderungen in der Gesamtmenge der am Locus anwesenden Polymerase scheinen die Phosphorylierungen von Serin 2 und 5 der RPB1 CTD durch PT-S264

nicht gestört zu werden. Zur weiteren Klärung könnte ein Experiment mit den Elongationsinhibitoren DRB und Flavopiridol zum Vergleich durchgeführt werden. Diese inhibieren CDK9 und beeinflussen somit auch die Phosphorylierung von Serin 2 der CTD-*Repeats*. Jedoch würde die Inhibition von CDK9 dazu führen, dass die Polymerase nicht in die produktive Elongation fortschreitet. Somit würde wahrscheinlich ihre Anwesenheit im Genkörper generell sinken.

Aus den Erkenntnissen der Kapitel 5.2.1, 5.2.3 und 5.2.4 ergaben sich starke Hinweise darauf, dass der Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten bereits am Schritt der Transkriptionsinitiation angreift und nicht erst beim Promotor-proximalen Pausieren oder der Elongation. Angesichts dieser Hinweise wurden die Experimente zu den RPB1 CTD-Phosphorylierungen nicht weiter verfolgt.

5.2.3 PT-S264 unterdrückt die Rekrutierung von TFIIB zum *Scaffold-Komplex*

In ChIP-qPCR Experimenten wurde gezeigt, dass der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 zu einer verminderten Rekrutierung von TFIIB zum Transkriptionsstart des Zielgens *ANGPTL4* führt. Wie zuvor schon für die RNA-Polymerase II beobachtet, konnte die verstärkte Rekrutierung von TFIIB bei Gabe des aktivierenden Stimulus TGF β_1 durch PT-S264 unterbunden werden. Die Anwesenheit anderer GTFs (TFIIA, TBP und TFIIH) wurde hingegen durch den inversen PPAR β/δ Agonisten nicht beeinflusst. Ein früheres ChIP-Experiment von T. Adhikary (Anhang, Abb. Z4), in dem TFIIB, TFIIA und RPB1 parallel betrachtet wurden, zeigte vergleichbare Ergebnisse. Am Transkriptionsstart von *TSC22D3*, welches kein PPAR-Zielgen ist, zeigte sich kein Einfluss von PT-S264 auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II und von TFIIB. Dies weist darauf hin, dass die beobachteten Effekte von PPAR abhängig sind. Da die Anwesenheit anderer GTFs am *ANGPTL4* TSS nicht vermindert ist, wird die Rekrutierung von PIC-Komponenten nicht generell blockiert und der Promotor scheint prinzipiell zugänglich zu sein.

Die Rekrutierung der RNA-Polymerase II erfordert, wie bereits in Kapitel 1.4.1 erläutert, die Anwesenheit von TFIIB ^[216]. Somit könnte die Unterdrückung der TFIIB-Rekrutierung durch PT-S264 eine der Ursachen für die beobachtete verminderte Rekrutierung der Polymerase sein. Die Anwesenheit der generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TBP und TFIIH am Transkriptionsstart, während TFIIB und die Polymerase II abwesend sind, entspricht der Konstellation des von Yudkovsky *et al.* 2000 ^[318] beschriebenen *Scaffold-Komplexes*. Nach dem dort beschriebenen Modell verbleiben einige Komponenten des PIC nach der ersten Initiation am Transkriptionsstart, um den geschwindigkeitslimitierenden Schritt einer Neuformation des PIC zu umgehen. Durch die verhältnismäßig schnelle Reinkorporation von TFIIB, TFIIF und der RNA-Polymerase II entsteht der Reinitiationskomplex (RIC) von dem eine weitere Transkriptionsrun-

de gestartet werden kann. Die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.3 stehen im Einklang mit diesem von Yudkovsky *et al.* anhand eines *in vitro* Systems postulierten Modell und könnten darauf hindeuten, dass eine vergleichbare Situation auch *in vivo* vorkommt. Wie Haas *et al.* 2018 ^[96] zeigten, ist die *de novo* Rekrutierung der RNA-Polymerase II von TFIIB abhängig. Dies weist ebenfalls darauf hin, dass die verminderte Rekrutierung der Polymerase eine Folge der beeinträchtigten TFIIB-Rekrutierung sein könnte. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten legen nahe, dass PPAR β/δ bei Bindung des inversen Agonisten PT-S264 die Reinkorporation von TFIIB und der RNA-Polymerase II in den *Scaffold*-Komplex stört. Somit würde die Transition zum RIC blockiert und es könnte keine Reinitiation erfolgen, um eine neue Transkriptionsrunde zu starten.

Anhand der vorliegenden Daten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bereits die erste Formation des PIC gestört ist. In manchen Experimenten deutete sich auch für TFIIH das charakteristische Muster einer reduzierten Rekrutierung bei Gabe eines inversen PPAR β/δ Agonisten an. Nach dem sequentiellen Modell der PIC-Formation wird TFIIH als letzte Komponente zum PIC rekrutiert (Kapitel 1.4.1). Eine Anwesenheit von TFIIH bei Abwesenheit von TFIIB und der Polymerase weist daher auf das Vorliegen eines *Scaffold*-Komplexes hin. Wenn TFIIH jedoch ebenfalls nicht anwesend ist, könnte bereits die erste Bildung des PIC noch vor der Rekrutierung von TFIIH beeinträchtigt sein.

5.2.4 PT-S264 verhindert die Rekrutierung aktivierender Mediator-Untereinheiten

Mittels *Scanning* ChIP-qPCR konnte gezeigt werden, dass der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 die durch den aktivierenden Stimulus TGF β_2 verstärkte Rekrutierung der Mediator-Untereinheiten MED1, MED26 und MED13L unterdrückt. Die MED1- und MED26-Untereinheiten des Mediators werden mit einem aktiven Zustand des Komplexes in Verbindung gebracht, der eine Bindung der RNA-Polymerase II und eine aktive Transkription erlaubt ^[185, 268, 322]. Beide Untereinheiten sind nicht immer im Mediator vorhanden. Anhand der Daten lässt sich daher leider nicht beurteilen, ob lediglich deren Rekrutierung zum restlichen Mediator-Komplex verhindert wird oder ob der gesamte Mediator-Komplex bei Gabe von PT-S264 nicht mehr zum *ANGPTL4* TSS rekrutiert wird. Bisher ist in unserem Labor kein Antikörper gegen eine andere Mediator-Untereinheit bekannt und erfolgreich getestet, der diese Frage eindeutig klären könnte.

MED13L ist eine Untereinheit des Kinase-Moduls. In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass die Bindung des Kinase-Moduls an den Mediator-Komplex die gleichzeitige Bindung der RNA-Polymerase II ausschließt ^[141]. Jedoch weisen Beobachtungen von Daniels *et al.* aus dem Jahr 2013 ^[58] darauf hin, dass das MED13L enthaltende Kinase-Modul eine Sonderstellung ein-

nehmen könnte. Während die Untereinheit MED26 abwesend ist, wenn das gebundene Kinase-Modul die MED13-Untereinheit enthält, kann MED26 im Mediator-Komplex anwesend sein, wenn das Kinase-Modul stattdessen die Untereinheit MED13L aufweist. Die Zusammensetzung des Kinase-Moduls könnte also möglicherweise die Auswirkungen von dessen Bindung an den Mediator-Komplex auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II beeinflussen. Es wurden auch ChIP-Experimente mit Antikörpern für andere Untereinheiten des Kinase-Moduls durchgeführt. Damit sollte getestet werden, ob die Rekrutierung des gesamten Kinase-Moduls oder spezifisch die Rekrutierung des MED13L-tragenden, und somit evtl. eher mit einer Aktivierung in Verbindung stehenden Kinase-Moduls, durch PT-S264 gestört wird. Leider konnte mit den eingesetzten Antikörpern gegen MED12, MED13 und CDK8 (zwei getestete Antikörper) keine ausreichende und spezifische Anreicherung über den Background hinaus erzielt werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass in Anwesenheit des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 die Rekrutierung der Mediator-Untereinheiten MED1, MED26 und MED13L blockiert wird. Wie bereits in Kapitel 1.5.2 ausgeführt wurde, erleichtert der Mediator-Komplex die Rekrutierung von TFIIB und ist mit diesem GTF gemeinsam für die Rekrutierung der RNA-Polymerase II erforderlich ^[18]. Die Rekrutierung von TFIIB ist Mediator-abhängig, während die Rekrutierung des Mediators hingegen unabhängig von TFIIB erfolgt ^[18]. Uthe *et al.* analysierten 2017 ^[285] das Interaktom des Mediators in *S. cerevisiae* und identifizierten TFIIB als einen der stärksten Interaktoren mit einer ähnlich hohen Interaktionsstöchiometrie wie die RNA-Polymerase II. Somit könnte die verminderte Anwesenheit der Mediator-Untereinheiten (oder des gesamten Mediators) ursächlich sein für die Beeinträchtigung der TFIIB-Bindung und letztlich der verminderten Rekrutierung der RNA-Polymerase II am *ANGPTL4* Transkriptionsstart.

5.3 Identifizierung beteiligter Co-Repressoren

5.3.1 Untereinheiten der NCoR/SMRT-Komplexe wurden als spezifische Interaktoren in Anwesenheit des inversen Agonisten detektiert

Die Interaktom-Analysen mittels ChIP-MS nach dem RIME-Protokoll ergaben, dass die NCoR/SMRT Komplex Untereinheiten NCoR, SMRT und TBL1XR1 spezifisch in Anwesenheit des inversen Agonisten PT-S264, jedoch nicht in Anwesenheit des Agonisten L165,041, mit PPAR β/δ interagieren. Innerhalb des NCOR2-Clusters konnten deutlich mehr Peptide NCoR zugeordnet werden als SMRT. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass in MDA-MB231-*luc2* die Bindung von NCoR an PPAR β/δ in Anwesenheit des inversen Agonisten dominant gegenüber der Bindung von SMRT ist.

PPAR β/δ und sein Dimerisierungspartner RXR konnten erwartungsgemäß sowohl in Anwesenheit des inversen Agonisten als auch in Anwesenheit des Agonisten detektiert werden. Die Anzahl der eindeutig identifizierten Peptide lag in den L165,041 behandelten Proben im Vergleich zu den PT-S264 behandelten Proben höher (16 gegenüber 10 für *PPARD* und 14,5 gegenüber 8 für *RXR*). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Immunpräzipitation mit dem PPAR β/δ -Antikörper in den L165,041 behandelten Proben eine bessere Anreicherung erzielte. Dass bei der Behandlung mit dem Agonisten dennoch keine Peptide für NCoR, SMRT und TBL1XR1 detektiert wurden, unterstreicht die Spezifität ihrer Interaktion mit PPAR β/δ ausschließlich bei Bindung des inversen Agonisten und ihre Abwesenheit bei Bindung des Agonisten.

Bereits in früheren ChIP-Experimenten wurde beobachtet, dass die DNA-Anreicherung mit dem PPAR β/δ -Antikörper sc-7197 in Anwesenheit von Liganden erhöht ist. Da die Anreicherung mit einem RXR-Antikörper im selben Experiment hingegen unverändert blieb, wird eine Konformationsänderung des PPAR β/δ -Kernrezeptors als Ursache vermutet. Der Hersteller des PPAR β/δ -Antikörpers sc-7197 (*Santa Cruz Biotechnology*) gibt als Epitop die N-terminalen Aminosäuren 1-75 an. Diese Angabe ist jedoch fraglich, da in der eigenen Masterarbeit ^[155] die Deletionsmutante Δ AF1 (Δ 1-71) mit diesem Antikörper in ChIP-Experimenten detektiert werden konnte. Die erhöhte Anreicherung in Anwesenheit von Liganden erwies sich für den ChIP-massenspektrometrischen Ansatz als nützlich, da zuvor in unbehandelten Zellen keine ausreichende Abdeckung erreicht werden konnte ^[155]. Aufgrund dieser technischen Schwierigkeit, konnte das Experiment nicht mit unbehandelten Zellen durchgeführt werden. Erst durch die Behandlung mit PT-S264 bzw. L165,041 konnte schließlich eine gute Abdeckung erreicht werden.

Neben den NCoR/SMRT-Komplex Untereinheiten NCoR, SMRT und TBL1XR1 ergaben die ChIP-MS Daten keine anderen bekannten transkriptionellen Co-Repressoren. Dieses Ergebnis erscheint zunächst widersprüchlich in Anbetracht der RNA-Interferenz Experimente, die nahelegten, dass die bekannten Co-Repressoren NCoR und SMRT nicht für die Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten erforderlich sind. Allerdings ist bei RNAi-vermittelten *Knockdowns* zu bedenken, dass auf Proteinebene zumeist lediglich eine partielle Depletion erreicht wurde. Ist das betreffende Protein in großem Überschuss in den Zellen vorhanden, so kann bereits die verbleibende Menge des Proteins zum Erhalt der untersuchten Funktion ausreichen. Wie aus der Überprüfung der *Knockdowns* in Adhikary *et al.* 2013 ^[8] auf Proteinebene per Western Blot hervorgeht (Anhang, Abb. Z2), konnte das Proteinlevel von NCoR (und HDAC3) zwar deutlich gesenkt werden, es verbleibt allerdings (im Gegensatz zum PPAR β/δ -*Knockdown*) noch eine nicht unerhebliche Menge des Proteins. Die Senkung des Proteinlevels von NCoR führte zwar zur Aufhebung der basalen Repression, jedoch blieb die Repression durch den inversen Agonisten ST247 unbeeinflusst. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass durch die Bindung des inversen Agonisten eine Konformationsänderung induziert wird, die die Affinität von PPAR β/δ für den Co-Repressor deutlich steigert. Während

sich das verminderte Proteinlevel des Co-Repressors im unligierten Zustand von PPAR β/δ deutlich bemerkbar macht, kann der Co-Repressor durch die erhöhte Affinität bei Bindung des inversen Agonisten weiterhin in ausreichendem Maße zu PPAR β/δ rekrutiert werden, sodass die Repression aufrecht erhalten werden kann.

5.3.2 Der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 führt zur verstärkten Rekrutierung von Untereinheiten der NCoR/SMRT-Komplexe an PPRES

In ChIP-qPCR Experimenten konnten die Ergebnisse der ChIP-MS Analysen bestätigt werden, wonach die Rekrutierung von NCoR und SMRT an PPAR β/δ in einer vom Ligandentyp abhängigen Weise erfolgt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 zu einer verstärkten Rekrutierung der NCoR/SMRT-Komplex Komponenten NCoR, SMRT und HDAC3 im Vergleich zum unligierten PPAR β/δ -Rezeptor führt. Die verstärkte Rekrutierung der Co-Repressoren war sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des aktivierenden Stimulus TGF β_1 zu beobachten. Bei einer Behandlung mit dem PPAR β/δ -Agonisten L165,041 war keine Bindung der Komplex-Komponenten NCoR, SMRT, HDAC3 und TBLR1 an den *ANGPTL4* und *PDK4* PPRES detektierbar. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der ChIP-MS Analysen überein, in denen ausschließlich in den PT-S264 behandelten Proben Peptide für NCoR, SMRT und TBLR1 identifiziert wurden.

In den ChIP-MS Analysen wurde die Untereinheit HDAC3 der NCoR/SMRT-Komplex nicht detektiert. Die Daten aus Abbildung 31 zeigen jedoch, dass auch diese bei Bindung des inversen Agonisten anwesend ist und bei Bindung des Agonisten abwesend. Der Grund für die fehlende Detektion von HDAC3 in der ChIP-MS könnten Sensitivitätsprobleme sein, die in der Massenspektrometrie häufiger auftreten. HDAC3 (49 kDa) ist deutlich kleiner als NCoR und SMRT (> 200 kDa) und etwas kleiner als TBL1XR1 (56 kDa). NCoR/SMRT-Komplexe enthalten vier TBL1/TBL1R-Proteine, aber nur zwei HDAC3 Proteine. Weiterhin wäre es möglich, dass das *Crosslinking* von TBL1XR1 an NCoR bzw. SMRT effizienter verläuft.

Zusammenfassend kann aus den Daten geschlossen werden, dass NCoR/SMRT-Komplexe spezifische Interaktoren des unligierten sowie des inverse Agonisten gebundenen PPAR β/δ -Rezeptors sind. Die Bindung eines Agonisten führt hingegen, wie bereits aus der Literatur bekannt, zur Dissoziation der Co-Repressor Komplexe. In Adhikary *et al.* 2013 ^[8] wurde gezeigt, dass NCoR in großem Maße an der basalen Repression durch den unligierten PPAR β/δ -Rezeptor beteiligt ist. Aufgrund dieses Ergebnisses und der hier festgestellten verstärkten Rekrutierung zu Chromatin-gebundenem PPAR β/δ in Anwesenheit von PT-S264, kann postuliert werden, dass NCoR die transkriptionelle Repression von *ANGPTL4* durch PPAR β/δ sowohl im Basalzustand als auch bei Bindung eines inversen Agonisten vermittelt.

5.4 Charakterisierung des *PPARD* KO Klons und Rekonstitution

5.4.1 Der *Knockout* von $\text{PPAR}\beta/\delta$ konnte im Klon MDA-MB231-*luc2* 2B3 auf mehreren Ebenen nachgewiesen werden

Im Rahmen der eigenen Masterarbeit ^[155] konnte bereits der *Knockout* von *PPARD* im Klon MDA-MB231-*luc2* 2B3 mittels RT-qPCR auf funktioneller Ebene nachgewiesen werden. Es zeigte sich keine transkriptionelle Regulation des Zielgens *ANGPTL4* nach einer Behandlung mit dem $\text{PPAR}\beta/\delta$ Agonisten L165,041 bzw. dem inversen $\text{PPAR}\beta/\delta$ Agonisten PT-S264. Im Western Blot war keine verbleibende Expression von $\text{PPAR}\beta/\delta$ auf Proteinebene detektierbar. Die Subtypen $\text{PPAR}\alpha$ und $\text{PPAR}\gamma$ werden weiterhin exprimiert. Soweit es sich auf Proteinebene anhand der Western Blots beurteilen lässt, kam es während des CRISPR/ Cas9 vermittelten *Knockouts* von $\text{PPAR}\beta/\delta$ nicht zu unspezifischen Effekten auf die anderen PPARs. Auf Ebene der DNA-Bindung konnte mittels ChIP-qPCR die Abwesenheit von $\text{PPAR}\beta/\delta$ am Chromatin unter Betrachtung der PPRES verschiedener Zielgene gezeigt werden. Somit ist der erfolgreiche *Knockout* von $\text{PPAR}\beta/\delta$ im Klon 2B3 bestätigt.

Auffällig war eine erhöhte Anreicherung der betrachteten PPRES für die ChIP der anderen beiden PPAR Subtypen $\text{PPAR}\alpha$ und $\text{PPAR}\gamma$. In der Masterarbeit ^[155] wurde diese Beobachtung auch in den drei anderen KO-Klonen gemacht. Da eine Konformationsänderung der beiden Proteine als unwahrscheinlich erachtet wird, lässt dies Rückschlüsse auf eine verstärkte Rekrutierung der anderen PPAR-Subtypen bei einem *Knockout* von $\text{PPAR}\beta/\delta$ zu. Da für $\text{PPAR}\gamma$ im Western Blot keine verstärkte Proteinexpression festgestellt werden konnte (der $\text{PPAR}\alpha$ Western Blot konnte nicht verlässlich ausgewertet werden, allerdings war auf mRNA-Ebene keine verstärkte Expression messbar ^[155]), scheint dieser Effekt auf Ebene der DNA-Bindung selbst zu entstehen. Möglicherweise weist $\text{PPAR}\beta/\delta$ eine höhere Bindungsaffinität zu den untersuchten PPRES auf, sodass bei dessen Anwesenheit in der Zelle nur wenig $\text{PPAR}\alpha$ oder $\text{PPAR}\gamma$ an den PPRES binden kann. Ist $\text{PPAR}\beta/\delta$ jedoch abwesend, können die beiden anderen PPAR-Subtypen verstärkt binden. Shi, Hon und Evans beobachteten 2001 ^[259] eine Repression der $\text{PPAR}\alpha$ - und $\text{PPAR}\gamma$ -vermittelten Transkription durch $\text{PPAR}\beta/\delta$ und identifizierten eine Konkurrenz um die DNA-Bindung sowie die Rekrutierung von Co-Repressoren durch $\text{PPAR}\beta/\delta$ als Ursache. Dennoch ist die Bindung des Dimerisierungspartners RXR an den untersuchten PPRES im $\text{PPAR}\beta/\delta$ *Knockout* Klon 2B3 im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen reduziert. Das Gesamtlevel von DNA-gebundenen PPAR-RXR-Dimeren kann also von $\text{PPAR}\alpha$ und $\text{PPAR}\gamma$ im $\text{PPAR}\beta/\delta$ *Knockout* Klon 2B3 wohl nicht vollständig kompensiert werden. Dies deutet darauf hin, dass $\text{PPAR}\beta/\delta$ der Hauptfaktor ist, der in MDA-MB231-*luc2* Zellen an die PPRES der betrachteten Zielgene bindet.

5.4.2 Mutationen im *PPARD* Gen des MDA-MB231-*luc2* 2B3 Klons führen zu einem verfrühten Stopp-Codon

Die Sequenzierung des MDA-MB231-*luc2* 2B3 Klons ergab, dass es im Bereich der Erkennungssequenzen der gRNAs 1 und 3 zu Mutationen kam. Bei gRNA2 zeigte von vier Plasmid-Klonen keiner eine Veränderung. Obwohl dies darauf hindeutet, dass der Klon 2B3 in diesem Bereich keine Mutation trägt, ist aufgrund der geringen Anzahl betrachteter Klone nicht völlig auszuschließen, dass eines der *PPARD* Allele doch verändert wurde. Sofern der Klon 2B3 in diesem Bereich tatsächlich in allen *PPARD* Allelen die Wildtyp-Sequenz aufweist, sind für dieses Resultat mehrere Erklärungen denkbar. Möglicherweise konnte die Cas9 Nuklease durch die gRNA2 nicht zur Erkennungssequenz rekrutiert werden oder dort keinen Doppelstrang-Schnitt induzieren. Es wäre aber auch denkbar, dass zwar ein Doppelstrangbruch induziert wurde, dieser aber im Klon 2B3 fehlerlos repariert werden konnte.

Im Bindungsbereich von gRNA1 führt die Deletion eines Adenins innerhalb von Codon 105 (AAG = K) zu einer Verschiebung des Leserasters (AAG... zu AGC... = S...) (Anhang, Abb. Z8). Diese resultiert in der Veränderung der kodierten Aminosäuren ab Position 105 und führt schließlich zu einem verfrühten Stopp-Codon an Position 160. Alle sechs sequenzierten Plasmid-Klone trugen diese Mutation, was darauf hinweist, dass möglicherweise alle Allele des *PPARD* Gens von Klon 2B3 diese Mutation aufweisen. Um zu einer besseren Einschätzung zu gelangen, hätten allerdings mehr Klone sequenziert werden müssen.

Innerhalb der Erkennungssequenz von gRNA3 kam es in vier von acht Klonen zur Insertion eines Adenins, während die verbleibenden Klone die Wildtyp-Sequenz aufwiesen. Diese Insertion würde theoretisch zu einer Rückverschiebung zum ursprünglichen Leseraster führen. Allerdings liegt Codon 160, an dessen Position durch die Deletion des Adenins innerhalb von Codon 105 ein verfrühtes Stopp-Codon entsteht, vor der Erkennungssequenz der gRNA3. Somit hat die Rückverschiebung des Leserasters keine Konsequenzen, sofern tatsächlich alle Allele die Deletion in Codon 105 tragen. Ausgehend von zwei vorhandenen Allelen des *PPARD* Gens in Klon 2B3 könnten die Sequenzierungsergebnisse darauf hinweisen, dass ein Allel beide Mutationen trägt und das andere Allel nur die Deletion des Adenins in Codon 105 aufweist. Um eine verlässliche Aussage zu treffen, müssten allerdings für alle drei gRNA-Erkennungssequenzen deutlich mehr Klone sequenziert werden. Außerdem müsste mittels FISH überprüft werden, ob der Klon 2B3 tatsächlich nur zwei Allele des *PPARD* Gens besitzt.

Ein verfrühtes Stopp-Codon würde nach der Translation der mRNA theoretisch zu einem verkürzten Protein führen, das gegebenenfalls instabiler ist als das vollständige Genprodukt. Jedoch zeigte sich in der Masterarbeit eine drastische Reduktion der Expression von *PPARD* bereits auf mRNA-Ebene ^[155]. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die mRNA nach der

Transkription des mutierten *PPARD* Gens zu einem Substrat des *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) wird. Der translationsgekoppelte Prozess des NMD fungiert als Qualitätskontrollsystem, das aberrante mRNAs mit verkürztem offenen Leseraster (ORF, *open reading frame*) erkennt und abbaut ^[253]. *Exon-Junction* Komplexe, die nach dem Spleißen zunächst an den Exon-Exon-Grenzen verbleiben und während der ersten Translationsrunde entfernt werden, unterstützen die Erkennung von NMD-Substraten. Durch das verfrühte Stopp-Codon verbleibt hinter den Terminationsfaktoren in 3' Richtung ein *Exon-Junction* Komplex (sofern hinter dem verfrühten Stopp-Codon noch eine Exon-Exon-Grenze liegt). Die Interaktion der am verfrühten Stopp-Codon aktivierten Terminationsfaktoren mit dem verbliebenen *Exon-Junction* Komplex fördert den Aufbau des NMD Komplexes, der das *Decapping* und den Abbau der aberranten mRNA einleitet ^[253].

5.4.3 Der MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Klon konnte durch retrovirale Infektion erfolgreich rekonstituiert werden

Mittels Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass PPAR β/δ nach der Transduktion der MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen mit pMSCVbsd-*PPARD* auf Proteinebene exprimiert wird. Trotz des verhältnismäßig schwachen Expressionssystems liegt die pMSCV-getriebene Expression von PPAR β/δ weiterhin deutlich über dem endogenen Level in MDA-MB231-*luc2* Zellen. Dies sollte für die weiteren Experimente bedacht werden, da es durch die erhöhte Expression zu Ungleichgewichten kommen könnte, bezüglich PPAR β/δ selbst oder durch die Rekrutierung von Co-Faktoren, die limitierend werden könnten. Eine noch schwächere ektopische Expression wäre wünschenswert, um der Wildtyp-Situation näher zu kommen. Jedoch gehört der pMSCVbsd-Vektor bereits zu den schwächsten Expressionssystemen.

Die basale Repression der *ANGPTL4* Transkription durch PPAR β/δ konnte durch die Transduktion der MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen mit pMSCVbsd-*PPARD* nahezu vollständig wiederhergestellt werden. Während die Repression durch den inversen Agonisten etwas schwächer ausfiel, zeigte sich eine leicht verstärkte Aktivierung durch den Agonisten im Vergleich zu MDA-MB231-*luc2* Wildtyp Zellen. Möglicherweise ist die schwächere Repression durch PT-S264 darauf zurück zu führen, dass die bei Bindung des inversen Agonisten verstärkt rekrutierten Co-Repressoren aufgrund des erhöhten Proteinlevels von PPAR β/δ limitierend werden.

5.5 Funktioneller Screen von PPAR β/δ Mutanten

5.5.1 Technische Probleme und Optimierungsansätze für den Screen

Während der ersten Experimente des Rekonstitutionsscreens mit PPAR β/δ -Mutanten in der Masterarbeit ^[155] kam es zu technischen Problemen, die Optimierungsansätze für die weiteren Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit boten.

In früheren Beobachtungen der Arbeitsgruppe zeigte sich eine Abhängigkeit des basalen *ANGPTL4* Transkriptlevels vom Konfluenzstatus der Zellen, wobei eine hohe Zelldichte mit einem niedrigen Transkriptlevel des PPAR β/δ -Zielgens korrelierte. Aus diesem Grund wurden die Zellen bereits in der Masterarbeit dünn ausgesät. Jedoch führten Ungleichmäßigkeiten in der Verteilung der Zellen im verwendeten 12-*well* Format zu möglichen Artefakten bei der Beurteilung einer Beeinträchtigung der transkriptionellen Regulation durch PPAR β/δ in den Mutanten. Daher wurden die weiteren Experimente im Rahmen der Doktorarbeit im 6-*well* Format durchgeführt, in welchem die Problematik der Dichteunterschiede in den *wells* nicht auftrat.

Bereits während der Masterarbeit zeigte sich bei Betrachtung der parallel zu den Mutanten ausgesäten und behandelten PPAR β/δ -Wildtyp rekonstituierten Zellen ein weiteres technisches Problem. Wie bereits in Kapitel 4.5.1 angedeutet, kam es mit steigender Passagenanzahl zur Verschlechterung des repressiven Effektes der PT-S264 Behandlung. Diese Veränderung wurde so nicht erwartet, da die Rekonstitution der Zellen durch retrovirale Infektion erfolgte und bei diesem Vorgehen von einer konstanten Expression des Proteins und auch einer konstanten Funktion des Proteins ausgegangen wird. Aufgrund der beobachteten Verschlechterung der Repression durch PT-S264 wurde bereits in der Masterarbeit das PPAR β/δ -Proteinlevel mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Annahme der konstanten Expression des Proteins nicht korrekt ist, sondern dass im zeitlichen Verlauf ein Anstieg des Proteinlevels zu verzeichnen ist. Zur Veranschaulichung zeigt Abb. 51 den Western Blot aus der Masterarbeit.

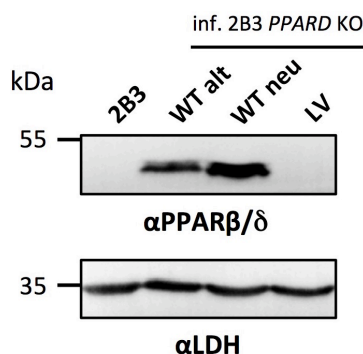


Abbildung 51: Western Blot, Anstieg des PPAR β/δ -Proteinlevels im zeitlichen Verlauf nach der retroviralen Rekonstitution von 2B3 PPARD KO Zellen. Direkt nach Abschluss der Selektion (WT alt) und ca. zwei Monate später (WT neu) wurden Gesamtzellextrakte geerntet. Die Proteine wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Aus der eigenen Masterarbeit ^[155].

Diese verstärkte PPAR β/δ -Expression könnte dazu führen, dass die bei Bindung des inversen Agonisten rekrutierten Co-Repressoren limitierend werden, was schließlich in einer schwäche-

ren Repression durch den Liganden resultiert. Aufgrund des beobachteten Driftens wurden die infizierten Zellen, wie bereits in Kapitel 4.5.1 erläutert, nur bis zur fünften Passage verwendet. Lediglich wenn hohe Zellzahlen für ChIP-Experimente erforderlich waren, erfolgte eine längere Kultivierung. Für zukünftige Experimente sollte ausgetestet werden, ob der Anstieg der PPAR- β/δ -Expression im zeitlichen Verlauf durch eine Senkung Blasticidin-Konzentration im Medium vermieden werden kann.

Wie ebenfalls bereits in Kapitel 4.5.1 angesprochen wurde, erschwerten technische und biologische Schwankungen die Beurteilung einer Beeinträchtigung der Regulation durch PPAR β/δ . Daher wurde für die Berechnungen auf die Mittelwerte aus 19 biologischen Replikaten von Wildtyp PPAR β/δ -rekonstituierten 2B3 Zellen zurückgegriffen.

5.5.2 Kritische Beurteilung des funktionellen Screens

Für viele der 80 im retroviralen Rekonstitutionsscreen untersuchten PPAR β/δ Mutanten wurde die Infektion und die Behandlung mit Liganden, gefolgt von einer RT-qPCR, nur einmal durchgeführt (insbesondere für die Mutanten, die initial keine Beeinträchtigung zeigten). Hierdurch könnte es, auch aufgrund der gegebenen Schwankungen im Assay, zu falsch-negativen Ergebnissen gekommen sein. Um die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse zu vermindern, wurden für die meisten Mutanten mit einer Beeinträchtigung mehrere biologische Replikate durchgeführt. Ausnahmen bilden hierbei Mutanten, die Defekte der DNA-Bindung (G146A, eingeschränkt R147K) oder der Heterodimerisierung (A404K, A404W, L406R) zeigen oder für die eine Mutation zu einer anderen Aminosäure stärkere Beeinträchtigungen ergab (H413A). Sofern mit bestimmten Mutanten weitere Experimente geplant werden, sollten die Ergebnisse dennoch durch weitere biologische Replikate abgesichert werden. Ziel des Screens war unter anderem die Identifikation von Mutationen anhand derer sich weitere Erkenntnisse über die transkriptionelle Regulation durch PPAR β/δ ableiten lassen, wobei insbesondere die verstärkte Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten im Vordergrund stand. Drei Mutanten, die eine Beeinträchtigung der basalen Repression zeigen, wurden für weitere Experimente eingesetzt. Für diese wurden zuvor mehrere biologische Replikate durchgeführt (Kapitel 4.6.1).

Die Auswahl der im Screen untersuchten Mutationen erfolgte nicht zufällig, sondern aufgrund von Überlegungen anhand von Kristallstrukturen der drei PPAR-Subtypen und nach Hinweisen aus der Literatur. Vor allem der Vergleich von PPAR α -Strukturen bei Bindung eines inversen Agonisten (PDB ID 1KKQ) und bei Bindung eines Agonisten (PDB ID 1K7L) lieferte Anhaltspunkte für Aminosäure-Positionen, die möglicherweise auch bei PPAR β/δ für die Ligandenresponsivität erforderlich sein könnten. Diese Herangehensweise erklärt den relativ hohen Anteil (über 50 %) von Mutanten, die tatsächlich eine Beeinträchtigung zeigten. Der gesetzte Cut-

off von 1,5 entsprechend einer 2,8-fachen Veränderung gegenüber der beim Wildtyp beobachteten Regulation wird als relativ stringent eingeschätzt. Es wird als wahrscheinlicher erachtet, dass der hohe Anteil positiver Hits aus der voreingenommenen Auswahl der Mutationen resultiert und nicht aus der Wahl eines zu niedrigen Cutoffs.

5.5.3 Die Deletion der AF1 führt zur verminderten basalen Repression, die Deletion der AF2 hat einen Verlust der Aktivierung zur Folge

Die Ergebnisse des Screens deuten eine Funktion der AF1 für die basale Repression an, da diese in der Deletionsmutante 72-441, der die AF1 fehlt, verringert war. Auch die Aktivierung der *ANGPTL4* Transkription durch den Agonisten war leicht vermindert. Da diese Verminderung allerdings nur knapp über dem angelegten Schwellenwert lag, ist sie wahrscheinlich eine Folge der beeinträchtigten basalen Repression, die zu einem erhöhten basalen Transkriptlevel und somit zu einem verringerten Potential für eine weitere Aktivierung der Transkription durch den PPAR β/δ Agonisten führt.

Bei beiden Deletionsmutanten der AF2 kam es zu einem Verlust der transkriptionellen Aktivierung durch den Agonisten. Dieser Effekt war bereits bei der Deletion der Helix 12 vollständig ausgeprägt. Die zusätzliche Deletion der L-Box (Loop zwischen Helix 11 und 12) führte zu keinem weiteren Funktionsverlust. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Helix 12 für die Aktivierung durch Agonisten erforderlich ist. Für die basale Repression sowie die Repression durch den inversen Agonisten scheinen weder die Helix 12 noch die L-Box eine entscheidende Rolle zu spielen. Die repressiven Regulationstypen waren nur sehr leicht geschwächt (unterhalb des Cutoffs).

Die nachfolgenden Ausführungen und Interpretationen beziehen sich auf die Beobachtungen aus den Kristallstrukturen von PPAR α mit dem Agonisten GW409544 (PDB ID: 1K7L) und dem inversen Agonisten GW6471 (PDB ID: 1KKQ) sowie die in diesen Strukturen gebundenen Peptide von Co-Regulatoren. Bei Bindung des Agonisten übernimmt die Helix 12 in der angewinkelten, über die Bindungstasche gebeugten Konformation eine wichtige Funktion, indem sie an der Bildung der hydrophoben Interaktionsoberfläche für Co-Aktivatoren beteiligt ist. In der von der LBD abgespreizten Position bei Bindung eines inversen Agonisten, scheint sie allerdings nicht mit der Interaktion mit Co-Repressoren in Verbindung zu stehen. Der inverse Agonist drückt die Helix 12 aus der aktiven Konformation, sodass diese wegklappt und so eine erweiterte Interaktionsoberfläche für Co-Repressoren zugänglich macht. Ein solches Modell entspricht dem Mechanismus eines Liganden-abhängigen *Switches* von einem ‚Off‘ Zustand eines Kernrezeptors in einen ‚On‘ Zustand, wie er in der Publikation von Aagaard *et al.* 2011 ^[1] beschrieben wurde (Abbildung 39 und Abbildung 52).

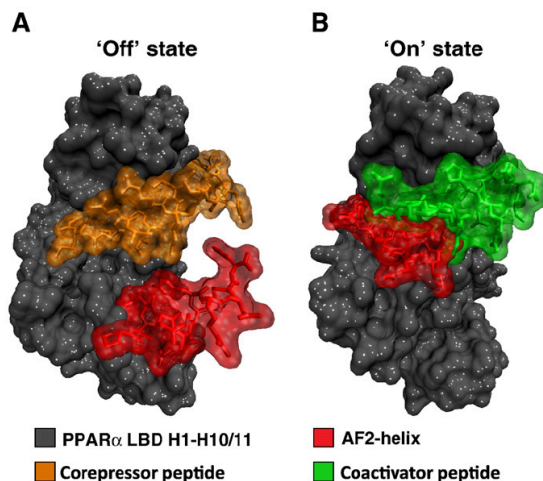


Abbildung 52: Die AF2-Helix wird abhängig vom gebundenen Liganden repositioniert. A) In Anwesenheit eines Antagonisten erlaubt die Position der AF2-Helix die Bindung von Co-Repressoren über erweiterte CoRNR-Box Sequenzen. B) Bei der Bindung eines Agonisten nimmt die AF2-Helix eine Position ein, die die Bindung von Co-Aktivatoren begünstigt. Zusätzlich besetzt die AF2-Helix in dieser Position einen Teil der erweiterten CoRNR-Box bindenden Oberfläche und verhindert dadurch die Bindung von Co-Repressoren. PDB ID A) 1KKQ, B) 1K7L, aus Aagaard *et al.* 2011 ^[1].

Bei der Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung eines Agonisten, beugt sich die Helix 12 (AF2-Helix) zur LBD und formt dabei eine hydrophobe Grube, in die spezifisch das LXXLL-Motiv (L = Leucin, X = beliebige Aminosäure) binden kann, ein Strukturmotiv über das die meisten Co-Aktivatoren mit Kernrezeptoren interagieren. Die Bindung eines inversen Agonisten induziert eine von der LBD abstehende Konformation der Helix 12. Dabei entsteht eine erweiterte Interaktionsoberfläche, die selektiv durch das strukturelle Motiv erkannt wird, über das Co-Repressoren mit Kernrezeptoren interagieren. Das bereits in Kapitel 1.3.1 beschriebene CoRNR-Box Motiv mit der Konsensussequenz LXXXIXXX(L/I) bildet im Vergleich zum LXXLL-Motiv eine verlängerte Helix aus, die in der aktiven Konformation der Helix 12 gegen diese stoßen würde (Abbildung 52 und Abbildung 57). Das Wegklappen der Helix 12 ist daher erforderlich, damit Co-Repressoren rekrutiert werden können. Weiterhin überlappen die Bindungsflächen für die CoRNR-Box und das LXXLL-Motiv, sodass sich die Bindung von Co-Repressoren und Co-Aktivatoren gegenseitig ausschließt (Abbildung 52 und Abbildung 57) ^[1].

5.5.4 Diskussion zu den Punktmutanten in L-Box und Helix 12

Unter den Mutationen im TETETS-Motiv der L-Box kam es nur bei den Mutanten von T423 und T427 zu deutlichen Beeinträchtigungen der Transkriptionsregulation. Die Mutante T423A zeigte eine verstärkte basale Repression, die mit einer verminderten Repression durch den inversen Agonisten und einer leicht verstärkten Aktivierung durch den Agonisten einherging. Die nur unvollständige Ausprägung der Effekte auf die ligandeninduzierte Regulation legt nahe, dass keine tatsächliche Veränderung dieser Regulationstypen vorliegt, sondern dass deren Beeinflussung lediglich aus der verstärkten basalen Repression resultiert. Hierdurch entsteht ein deutlich niedrigeres basales Transkriptlevel, was ein verringertes Potential für die Repression durch den inversen Agonisten und ein erhöhtes Potential für die Aktivierung durch den Agonis-

ten zur Folge hat. Ob der Einfluss auf die basale Repression darauf zurück zu führen ist, dass keine Phosphorylierung mehr stattfinden kann oder ob andere Unterschiede zwischen den Aminosäuren (Threonin = polar, Alanin = hydrophob; Anhang Abb. Z9) dafür verantwortlich sind, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. Dass die basale Repression in der *phospho-mimic* Mutante T423D funktioniert, könnte allerdings ein Indiz dafür sein, dass der Phosphorylierungszustand von Threonin 423 eine Rolle spielt.

Die Mutationen von Threonin 427 zu den hydrophoben Aminosäuren Alanin, Phenylalanin und Isoleucin bewirkte eine Beeinträchtigung der basalen Repression und der Aktivierung durch den Agonisten, wobei beide Effekte bei der Mutante T427I besonders deutlich ausfielen. Gleichzeitig funktionierte die Repression durch den inversen Agonisten bei diesen Mutanten besser. Ein solches Muster lässt vermuten, dass hier eigentlich nur die basale Repression beeinträchtigt ist und dass die Erhöhung des basalen *ANGPTL4* Transkriptlevels in einer Erhöhung des Repressionspotentials für inverse Agonisten sowie einer Verringerung des Aktivierungspotentials für Agonisten resultiert. Die *phospho-mimic* Mutante T427D zeigt ein gegensätzliches Muster: Die basale Repression funktioniert besser, während die Repression durch den inversen Agonisten geschwächt ist (unterhalb des Cutoffs). Betrachtet man die Ergebnisse zur Aminosäure T427 als Ganzes, so scheint die phosphorylierte Form die basale Repression zu begünstigen, während Mutationen, die eine Phosphorylierung unmöglich machen zu einer Beeinträchtigung der basalen Repression führen. Möglicherweise übernimmt die negative Ladung des angehängten Phosphats eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Konformation, die zur Rekrutierung von Co-Repressoren bei der basalen Repression erforderlich ist. Die Beeinträchtigung der Repression durch den inversen Agonisten bei der Mutante T427D ist wahrscheinlich eine Folge der gesteigerten basalen Repression, die eine Senkung des basalen Transkriptlevels und somit ein verringertes Potential für eine weitere Repression bewirkt.

Auch die Mutationen im LXXLL-Motiv hatten einen Einfluss auf die Transkriptionsregulation durch PPAR β/δ . So zeigte die Mutante L429A einen Verlust der Repression durch den inversen Agonisten und eine deutlich verminderte Aktivierung durch den Agonisten. Diese Beeinträchtigungen lassen sich anhand der Kristallstrukturen der PPAR α LBD bei Bindung eines Agonisten bzw. eines inversen Agonisten erklären. Bei der Bindung eines Agonisten ist das Leucin 429 durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäuren der Helix 3 daran beteiligt, die Helix 12 im über die Ligandenbindungstasche gebeugten, aktiven Zustand zu halten. Diese Wechselwirkungen entfallen durch die Mutation zu einem Alanin, sodass die Helix 12 nicht mehr die für die Rekrutierung von Co-Aktivatoren erforderliche Konformation einnehmen kann (Abbildung 53A). Bei der Bindung eines inversen Agonisten spielt das Leucin 429 wahrscheinlich eine entscheidende Rolle beim Herausdrücken der Helix 12 durch den inversen Agonisten, da sie eine sterische Behinderung im Bereich des verlängerten Arms des Liganden darstellt (Abbildung 53B).

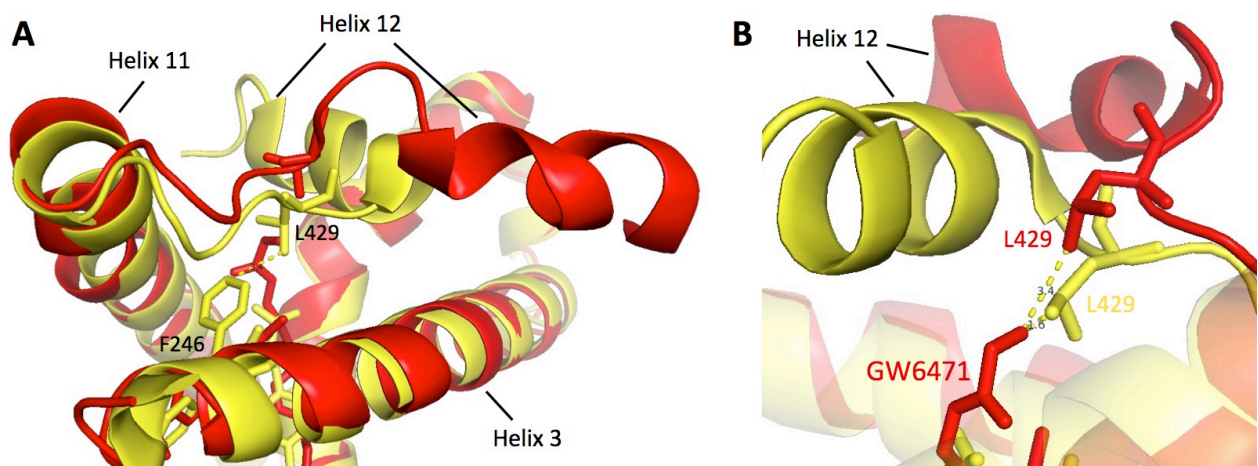


Abbildung 53: Rolle der Aminosäure L429 für die ligandeninduzierte Regulation. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). A) Die Aminosäure L429 (entspricht L456 in PPAR α) stabilisiert über hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäuren der Helix 3 die aktive Konformation der Helix 12. B) In der aktiven Konformation stellt L429 eine sterische Behinderung für den verlängerten Arm des inversen Agonisten dar. Möglicherweise spielt die Aminosäure daher eine entscheidende Rolle beim Herausdrücken der Helix 12 aus der aktiven Konformation in die abstehende repressive Konformation.

Für die Mutante L432A zeigte sich ein vergleichbares Muster wie bei der Mutante L429A, jedoch ist in dieser Mutante die basale Repression begünstigt. Die Beeinträchtigung der Aktivierung durch den Agonisten kann ähnlich wie bei L429 durch den Verlust hydrophober Wechselwirkungen erklärt werden, die für die Stabilisierung der Helix 12 in der aktiven Konformation benötigt werden. Zusätzlich trägt das Leucin zur Bildung einer hydrophoben Interaktionsoberfläche für den Co-Aktivatoren bei (Abbildung 54A). Wie genau es zur Begünstigung der basalen Repression kommt, kann anhand der Kristallstruktur nicht eindeutig festgestellt werden. Der Effekt ließe sich aber möglicherweise zum Teil dadurch erklären, dass die aktive Konformation nicht mehr eingenommen werden und keine Co-Aktivatoren rekrutiert werden können. Die Beeinträchtigung der Repression durch den inversen Agonisten ist so stark ausgeprägt, dass es fraglich erscheint, ob er ausschließlich durch die verstärkte basale Repression zustande kommt. Die Aminosäure liegt weiter vom inversen Agonisten entfernt, sodass hier eine Rolle für das Herausdrücken der Helix eher unwahrscheinlich ist. Möglicherweise bildet L432 allerdings nach der Konformationsänderung andere Wechselwirkungen aus, die erforderlich sind, um Helix 12 in der abstehenden Konformation zu halten. Die Mutation zur sehr ähnlichen, ebenfalls hydrophoben Aminosäure Isoleucin hatte sehr viel geringere Auswirkungen. Das ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass Isoleucin ähnliche Wechselwirkungen ausbilden kann.

Im Gegensatz zu den Mutationen des ersten und zweiten Leucins des LXXLL-Motivs, führte die Mutation des dritten Leucins L433 zu einem Alanin nur zu einem Verlust der Aktivierung durch den Agonisten. Die Repression durch den inversen Agonisten war nur leicht geschwächt (unterhalb des Cutoffs).

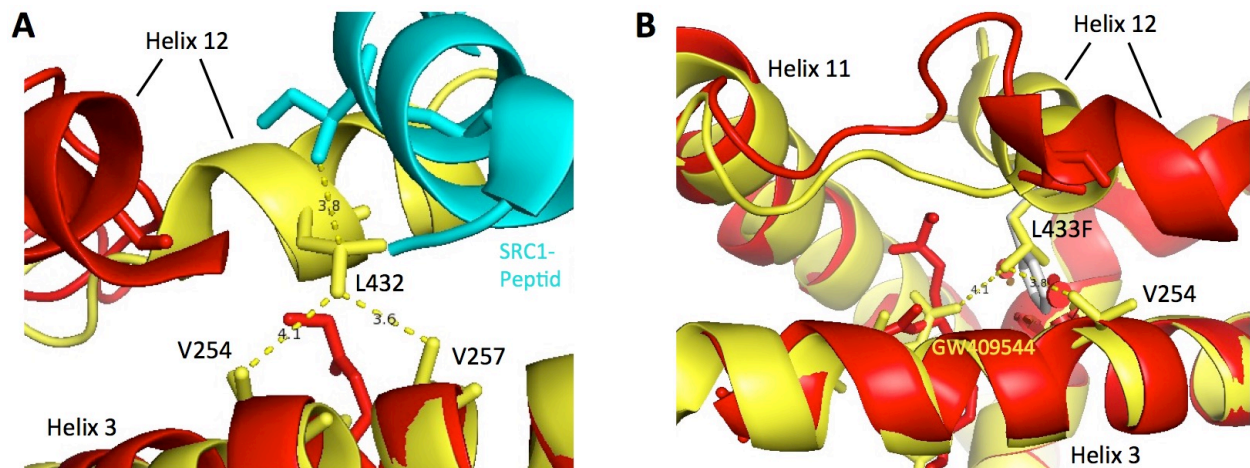


Abbildung 54: Rolle der Aminosäuren L432 und L433 bei der aktiven Konformation. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). Die Leucine 432 (A) und 433 (B) in PPAR β/δ (entsprechen L459 und L460 in PPAR α) stabilisieren die aktive Konformation der Helix 12 über hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäuren der Helix 3. L432 trägt außerdem zur Bildung einer hydrophoben Interaktionsoberfläche für Co-Aktivatoren (SRC1-Peptid, cyan) bei. B) Die Mutation von Leucin 433 zu einem Phenylalanin führt zu sterischen Behinderungen an Helix 3, sodass die Helix 12 nicht die aktive, über die Ligandenbindungsdomäne gebeugte Konformation einnehmen kann.

Bei den Mutationen zu den größeren Aminosäuren Phenylalanin und Isoleucin kam es zu einer verstärkten basalen Repression und durch das niedrigere basale Transkriptlevel zu einem schwächeren Effekt durch den inversen Agonisten. Da hier kein vollständiger Verlust zu beobachten war, scheint die Repression durch den inversen Agonisten nicht generell gestört zu sein, sondern die Schwächung scheint allein aus der verstärkten basalen Repression zu entstehen. Durch die Mutation von L433 zu einem Phenylalanin kam es außerdem zu einem nahezu vollständigen Verlust der Aktivierung durch den Agonisten. Sowohl bei L433A als auch L433F lässt sich der Verlust der Aktivierung durch den Agonisten anhand der Kristallstruktur erklären. Leucin 433 geht hydrophobe Wechselwirkungen mit Resten in Helix 3 und dem Liganden ein und trägt so zur Stabilisierung der von Helix 12 in der aktiven Konformation bei (Abbildung 46B) (von Zoete *et al.* 2007 für PPAR γ L469 beschrieben ^[324]). Diese Wechselwirkungen werden durch die Mutation zu einem Alanin geschwächt. In der Mutante L433F kommt es durch den großen aromatischen Ring des Phenylalanins zu sterischen Behinderungen zur Helix 3, sodass die Helix 12 nicht die aktive, über die Ligandenbindungstasche gebeugte Konformation einnehmen kann (Abbildung 54B).

Das LXXLL-Motiv ist ein Strukturmotiv über das in der Regel Co-Aktivatoren an Kernrezeptoren binden. Dass die PPARs ebenfalls ein hochkonserviertes LXXLL-Motiv enthalten, lässt vermuten, dass sie nicht ausschließlich direkt als Transkriptionsfaktoren agieren, sondern dass sie über das LXXLL-Motiv auch als Teil von anderen Proteinkomplexen auf einem indirekten Weg an der Transkriptionsregulation beteiligt sein könnten ^[274]. Tien *et al.* zeigten 2006 ^[274] für

PPAR α , dass der Rezeptor über das LXXLL-Motiv mit anderen LXXLL-Motiv enthaltenden Proteinen interagieren kann. Zusätzlich sind aber auch intramolekulare Wechselwirkungen möglich, wodurch das LXXLL-Motiv zur Proteinfaltung beitragen kann ^[274]. Auch für PPAR γ wurde beobachtet, dass das LXXLL-Motiv im C-Terminus an der Ausbildung eines Netzwerks von hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt ist, das zur Stabilisierung der Helix 12 in der aktiven Konformation und zur Bildung einer hydrophoben Interaktionsoberfläche für Co-Aktivatoren erforderlich ist ^[87, 324].

Durch die Mutationen von Histidin 430 in Helix 12 zu einem Lysin und Valin 254 in Helix 3 zu einem Arginin kam es zu einer Beeinträchtigung der Aktivierung durch den Agonisten. Wie aus den Kristallstrukturen hervorgeht, stabilisieren die Aminosäuren H430 und Q250 die Position der Helix 12 in der aktiven Konformation. Das Lysin in der H430K-Mutante verursacht aufgrund seiner Größe sterische Behinderungen an Helix 3 (Abbildung 55). Durch die Mutation von V254 zu einem Arginin treffen zwei positive Ladungen (mit H430) aufeinander. Neben sterischen Behinderungen aufgrund des größeren Restes, kommt es zu abstoßenden Kräften zwischen den Helices, sodass Helix 12 die aktive Konformation nicht mehr einnehmen kann (Abbildung 55).

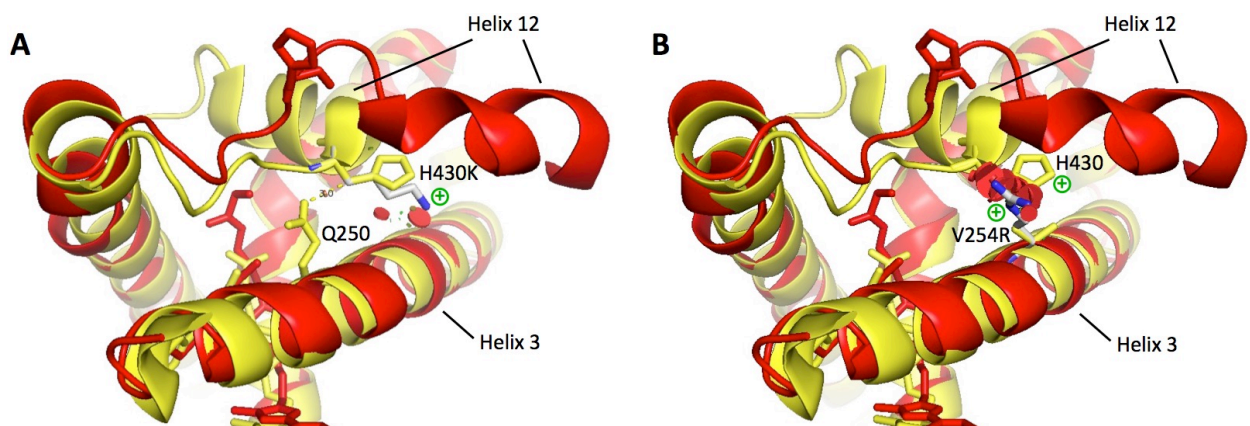


Abbildung 55: Störung der aktiven Konformation durch die Mutationen H430K und V254R. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). A) Histidin 430 in Helix 12 und Q250 in Helix 3 (entsprechen H457 und Q277 in PPAR α) stabilisieren die aktive Konformation der Helix 12. Die Mutation von H430 zu einem Lysin führt zu sterischen Behinderungen zwischen Helix 12 und Helix 3. B) Durch die Mutation von V254 zu einem Arginin treffen zwei positive Ladungen aufeinander (mit H430). Neben sterischen Behinderungen kommt es zwischen Helix 12 und 3 zu abstoßenden Kräften, sodass die aktive Konformation nicht mehr eingenommen werden kann.

Die Mutation von Glutamat 435 in Helix 12 zu einem Alanin führte zu einer deutlich verminderten Aktivierung durch den Agonisten. E435 und K265 sind an der Bildung eines Netzwerks von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Co-Aktivat Peptid beteiligt (Abbildung 56A). Wie von Zoete *et al.* 2007 beschrieben wurde, stabilisiert die von diesen Resten gebildete *Charge-Clamp* die Bindung von Co-Aktivatoren. Die Mutation des Tyrosin 437 in Helix 12 zu einem

Alanin resultierte in einem nahezu vollständigen Verlust der transkriptionellen Aktivierung durch den Agonisten. Auch die Repression durch den inversen Agonisten war vermindert. In der Kristallstruktur der PPAR α LBD bei Bindung eines Agonisten ist erkennbar, dass das Tyrosin mit dem Liganden und mit Aminosäuren der Helices 11 und 5 interagiert (Abbildung 56B). Diese Wechselwirkungen werden durch die Mutation zu einem Alanin geschwächt. Das Tyrosin 437 ragt in der aktiven Konformation in die Ligandenbindungstasche. Bei Bindung des inversen Agonisten würde sie in dieser Position sehr nahe am verlängerten Arm des Liganden stehen und könnte ein sterisches Hindernis darstellen. Möglicherweise unterstützt das Tyrosin 437 somit das Herausdrücken der Helix 12 bei Bindung des inversen Agonisten. Diese unterstützende Funktion geht durch die Mutation zu einem Alanin verloren, was die Ursache für die geschwächte Repression durch den inversen Agonisten sein könnte.

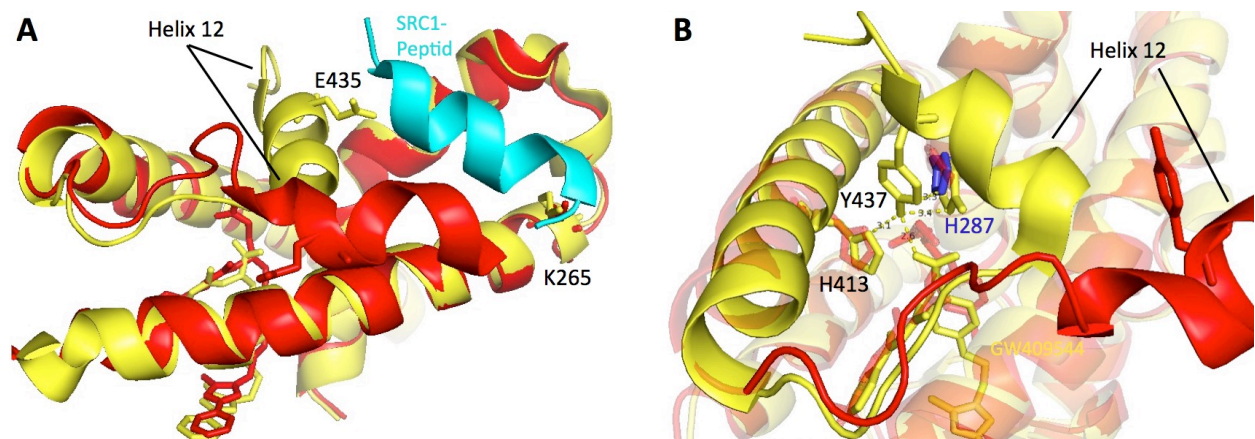


Abbildung 56: Rolle der Aminosäuren E435 und Y437 für die ligandeninduzierte Regulation. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). A) E435 und K265 (entsprechen E462 und K292 in PPAR α) sind an der Bildung eines Netzwerks von Wasserstoffbrücken mit dem Co-Aktivatoren beteiligt und stabilisieren so dessen Bindung. B) Y437 (entspricht Y464 in PPAR α) interagiert mit H413 in Helix 11 und H287 (blau, PPAR β/δ aus PDB ID 3TKM; an dieser Stelle sitzt in PPAR α ein Y) und dem Agonisten. Durch das Netzwerk von Wasserstoffbrücken wird die aktive Konformation der Helix 12 stabilisiert. Bei Bindung eines inversen Agonisten könnte Y437 in der aktiven Konformation ein Hindernis für den verlängerten Arm des Liganden darstellen und so das Herausdrücken der Helix 12 unterstützen.

Die Mutation zum einem Phenylalanin hatte deutlich geringere Auswirkungen (Beeinträchtigung der Aktivierung unterhalb des Cutoffs). Da das Phenylalanin dem Tyrosin ähnelt, kann es wahrscheinlich die hydrophoben Wechselwirkungen, die zur Stabilisierung der Helix 12 in der aktiven Konformation erforderlich sind, aufrecht erhalten. Michalik *et al.* untersuchten 2007^[184] die Dynamik der Helix 12 in PPAR α und fanden unter anderem eine Schlüsselrolle des entsprechenden Tyrosins für die Stabilisierung der Helix 12 in der aktiven Konformation. Dabei übernahmen die hydrophoben Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren eine wichtigere Funktion als die Interaktion mit dem Liganden. Auch für PPAR γ wurde beobachtet, dass das

entsprechende Tyrosin 473 an der Interaktion der Helix 12 mit der von den Helices 3, 5 und 10/11 geformten hydrophoben Tasche und somit an der Stabilisierung der aktiven Konformation beteiligt ist ^[87].

5.5.5 Zehn Mutanten zeigen einen Verlust aller drei untersuchten transkriptionellen Regulationstypen

Zehn der untersuchten Mutanten zeigten einen Verlust der basalen Repression, der verstärkten Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten und der Aktivierung der *ANGPTL4* Transkription durch den PPAR β/δ Agonisten. Aufgrund des Verlustes aller drei transkriptionellen Regulationstypen, erscheint es wahrscheinlich, dass diese Mutationen zu einem generellen Funktionsverlust des Kernrezeptors führen. Es sollte daher mittels Western Blot bzw. ChIP-qPCR überprüft werden, ob das Protein tatsächlich exprimiert wird und ob es noch an die DNA bindet. Allerdings lässt sich bei einigen der betroffenen Mutationen bereits anhand ihrer Position im Protein ableiten, was mutmaßlich der Grund für den Funktionsverlust ist.

In der Mutante C91A-E92A sind die beiden Aminosäuren Cystein und Glutamat der sogenannten P-Box zu zwei Alaninen mutiert. Die P-Box enthält die Aminosäuren ‚CEGCKG‘ der ersten α -Helix hinter dem ersten Zinkfinger der DBD, die für die sequenzspezifische Bindung von PPAR β/δ an die DNA erforderlich ist ^[1]. Diese α -Helix greift bei der DNA-Bindung in die große Furche der DNA und ist damit essentiell für die Erkennung der 5' *Repeat*-Sequenz des PPRE (Kapitel 1.1.5, Abbildung 4). Die vorgenommenen Mutationen resultieren daher mit großer Wahrscheinlichkeit in einem Defekt der DNA-Bindung. Gleiches gilt für die Mutante G146A, bei der das Glycin des RFGR-Motivs zu einem Alanin mutiert ist. Das RFGR-Motiv tritt bei der DNA-Bindung mit der 5'-flankierenden Sequenz AACT (bzw. AAGT) des PPRE in Kontakt (kleine Furche der DNA) (Kapitel 1.1.5, Abbildung 4) ^[43]. Die Aminosäure Glycin scheint eine wichtige Rolle bei der Interaktion zu spielen und somit für die DNA-Bindung des Kernrezeptors erforderlich zu sein.

Die Mutationen A404K, A404W und L406R liegen in Helix 10 der LBD. Wie Gampe *et al.* in einer Publikation aus dem Jahr 2000 ^[87] zeigten, bildet dieser Bereich die Dimerisierungsfläche für die Interaktion mit RXR, dem Heterodimerisierungspartner der PPARs (Kapitel 1.1.5, Abbildung 4). Hierbei ähneln die Aminosäuren 396-409 von PPAR β/δ dem Konsensus-Heterodimerisierungsmotiv für Dimerisierungspartner von RXR (siehe nächste Seite). Wahrscheinlich verhindern die Mutationen der Aminosäuren A404 und L406 die Dimerisierung mit RXR und somit auch die gemeinsame DNA-Bindung der Kernrezeptoren.

PPAR β/δ -Sequenz: FPKLLQKMADLRQL

Konsensus-Sequenz: $\Phi\psi$ K $\psi\psi\psi$ K $\psi\psi\Sigma\psi$ R $\psi\psi$

Φ = hydrophobe, aromatische Aminosäure (F, W, Y)

ψ = hydrophobe Aminosäure (präferenziell M, L, V, P, A oder I)

Σ = saurer Rest (D oder E)

Die Mutationen T261R, V279R und T261R-V279R stören wahrscheinlich die Bindung von Co-Regulatoren. Zoete *et al.* zeigten 2007 ^[324] für PPAR γ und seinen Agonisten Rosiglitazon, dass die entsprechenden Aminosäuren T297 und V315 an der Bildung der hydrophoben Interaktionsoberfläche für das LXXLL-Motiv des Co-Aktivators SRC1 beteiligt sind. Bei Betrachtung der Kristallstruktur der PPAR α LBD bei Bindung eines Agonisten bzw. eines inversen Agonisten fällt auf, dass die entsprechenden Aminosäuren T288 und V306 in räumlicher Nähe zu dem gebundenen Co-Aktivator bzw. Co-Repressor Peptid stehen. Auch die Aminosäure V284 (entspricht V257 in PPAR β/δ) ragt in Richtung der Co-Regulator Peptide.

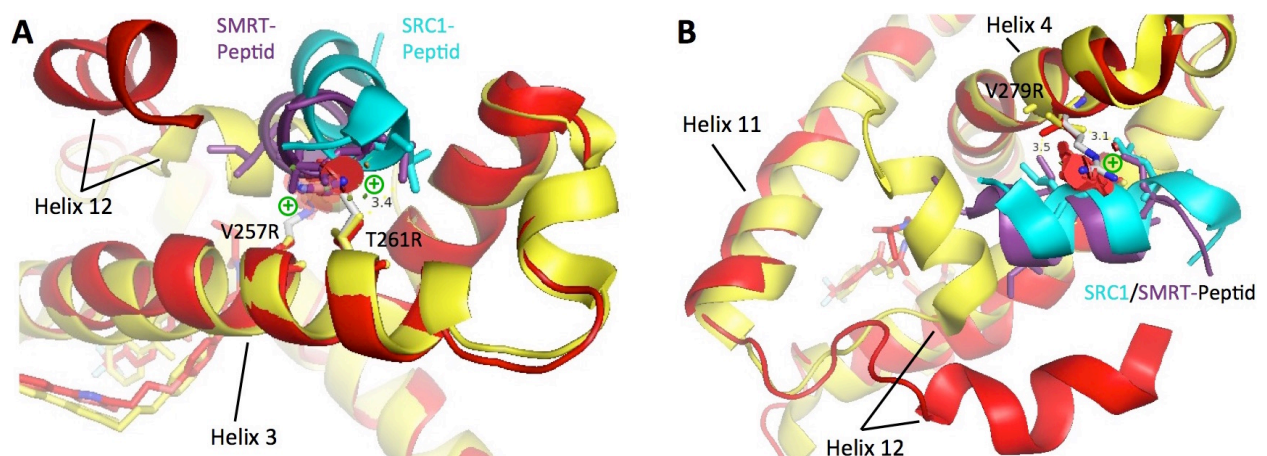


Abbildung 57: Sterische Behinderung der Co-Regulator Bindung und Störung der hydrophoben Interaktionsoberfläche bei den Mutanten V257R, T261R und V279R. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). Die Aminosäuren V257 und T261 (entspricht V284 und T288 in PPAR α) in Helix 3 (A) und die Aminosäure V279 (entspricht V306 in PPAR α) in Helix 4 (B) sind an der Bildung der hydrophoben Interaktionsoberfläche für die Co-Regulatoren beteiligt. Durch die Mutation zu Lysinen ragen die Reste weiter aus der Helix hervor und stellen eine sterische Behinderung für die Bindung von Co-Regulatoren dar. Die positive Ladung des Lysins stört zusätzlich die hydrophobe Bindungsfläche.

Abbildung 57 zeigt die Überlagerung der PPAR α LBDs mit Darstellung des Co-Aktivator Peptids von SRC1 (cyan) bei Bindung des Agonistsen bzw. des Co-Repressor Peptids von SMRT (violett) bei Bindung des inversen Agonisten. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich wird, führt die Mutation der Valine 257 und 279 (V284, V306 in PPAR α) sowie des Threonins 261 (T288 in PPAR α) zu einem Lysin zu einer sterischen Behinderung der Bindung sowohl des Co-Aktivators SRC1 als auch des Co-Repressors SMRT. Hinzu kommt, dass die positive Ladung des Lysins

die hydrophoben Interaktionsoberflächen für das LXXLL-Motiv des Aktivators und die CoRNR-Box des Repressors stört. Das Valin 279 liegt bei Bindung des Agonisten in räumlicher Nähe zum ersten und letzten Leucin des LXXLL-Motivs im Co-Aktivator Peptid. Bei Bindung des inversen Agonisten ist es in der Nähe des mittleren Isoleucins und des hinteren Leucins der CoRNR-Box LXXXIXXX(L/I) im Co-Repressor Peptid positioniert. Das negativ geladene Aspartat 439 (D466 in PPAR α) trägt wahrscheinlich durch seine Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Lysin 283 in Helix 4 (K310 in PPAR α) dazu bei, die Helix 12 in der aktiven Konformation zu halten (Abbildung 58). Der Verlust dieser Interaktion in den Mutanten D439A und K283A erklärt die Beeinträchtigung der Aktivierung durch den Agonisten. Warum in der Mutante D439A auch die basale Repression und die Repression durch den inversen Agonisten gestört werden, lässt sich anhand der Kristallstrukturen nicht direkt erkennen.

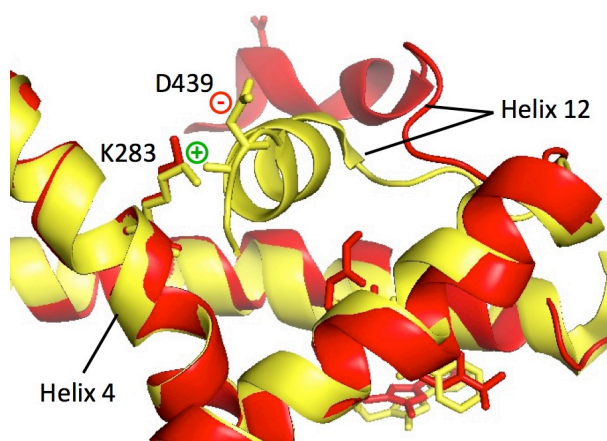


Abbildung 58: Stabilisierung der aktiven Konformation durch D439 und K283. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). Wechselwirkungen des negativ geladenen Aspartat 439 in Helix 12 und des positiv geladenen Lysin 283 in Helix 4 stabilisieren Helix 12 in der aktiven Konformation.

5.5.6 Die Mutation H413W beeinträchtigt die Ligandenbindung

Bei den Mutationen F324A, I420R und H413W kam es zu Beeinträchtigungen beider Liganden-vermittelter Regulationstypen. Die Aminosäuren F324 und I420 (entsprechen F351 und I447 in PPAR α) liegen in der Tertiärstruktur nah zusammen und ragen mit ihren hydrophoben Resten Richtung Ligandenbindungstasche (Abbildung 59A). Insbesondere F324 könnte an der Ausbildung der hydrophoben Interaktionsoberfläche für den Liganden beteiligt sein. Durch die Mutation von Isoleucin 420 zu einem Arginin könnte es zu sterischen Behinderungen und zur Störung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Helix 11 und Helix 7 durch die positive Ladung kommen (Abbildung 59B). Die räumliche Nähe der Aminosäuren I420 und F324 lässt vermuten, dass sie durch hydrophobe Wechselwirkungen zur Stabilität der Tertiärstruktur beitragen. Die Mutationen I420R und F324A verhindern diese Van-der-Waals Interaktionen, die wahrscheinlich als eine Art Verankerung der Helix 11 an Helix 7 dienen und für die Positionierung der Helix 12 eine wichtige Rolle spielen.

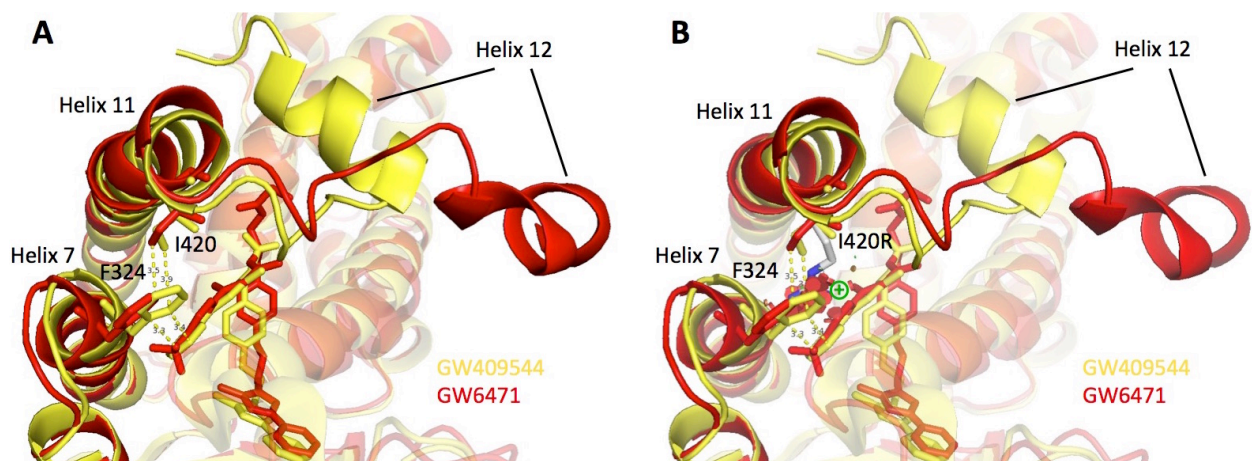


Abbildung 59: Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen F324, I420 und den Liganden. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). A) Die Aminosäuren F324 und I420 liegen in räumlicher Nähe und stabilisieren die Tertiärstruktur durch hydrophobe Wechselwirkungen. F324 ist mutmaßlich an der Bildung der hydrophoben Ligandenbindungstasche beteiligt. B) Die Mutation des Isoleucin 420 zu einem Arginin stört diese Wechselwirkungen durch die positive Ladung und führt zu sterischen Behinderungen zwischen Helix 7 und 11.

Lori *et al.* untersuchten 2012 ^[164] die PPAR γ Mutante F360L (entspricht F324 in PPAR β/δ), die mit familiärer partieller Lipodystrophie assoziiert ist und fanden eine ebensolche Schlüsselrolle des Phenylalanins an Position 360 für die Stabilisierung dieser Region der LBD. In der Publikation werden die Auswirkungen der Mutation F360L auf die Tertiärstruktur eingehend besprochen. Besonders fällt dabei eine Repositionierung der Helix 12 auf, die einem Zwischenzustand der Positionen in Kristallstrukturen der PPAR α LBD bei Agonisten bzw. inverse Agonisten-Bindung zu ähneln scheint (Abbildung 60).

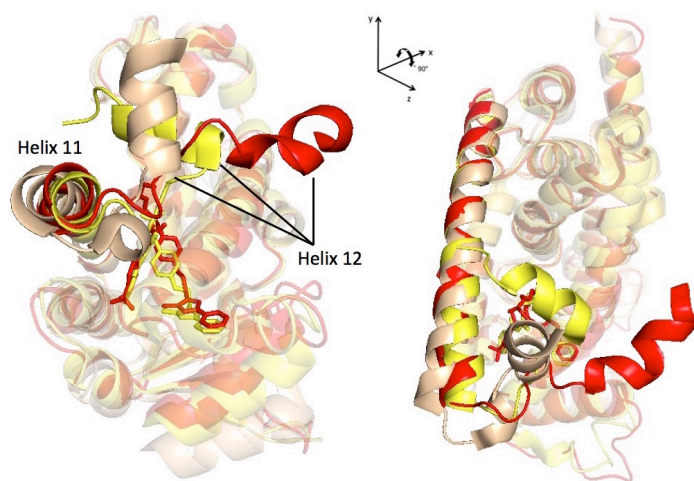


Abbildung 60: Vergleich der Positionen der Helix 12 in PPAR γ F360L mit den PPAR α -Strukturen. Überlagerung der Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus PDB ID 1KKQ (rot) und 1K7L (gelb) mit der Kristallstruktur der PPAR γ LBD aus PDB ID 4L96 ^[164] (beige). In der PPAR γ F360L Mutante ähnelt die Position der Helix 12 einem Zwischenzustand der Positionen bei der Bindung eines Agonisten und bei Bindung eines inversen Agonisten an PPAR α .

Die Mutationen I420R und F324A könnten ähnliche Auswirkungen auf die Tertiärstruktur haben und dazu führen, dass Helix 12 nicht mehr die aktive Konformation einnehmen kann. Gleichzeitig könnte die fehlende Verankerung von Helix 7 und 11 dazu führen, dass das Heraus-

drücken der Helix 12 durch den inversen Agonisten weniger gut funktioniert und die vollständig herausgeklappte Position nicht mehr erreicht wird. Das könnte zur Folge haben, dass die benötigte Interaktionsoberfläche für den Co-Repressor nicht vollständig freigegeben wird.

Die Mutation des Histidins an Position H413 zu einem Tryptophan bewirkte einen vollständigen Verlust der Aktivierung durch den Agonisten sowie der Repression durch den inversen Agonisten. Bei der Mutation zu einem Alanin wurde eine weniger deutliche Verringerung beider Regulationstypen beobachtet (beim inversen Agonisten unterhalb des Cutoffs). Histidin 413 liegt in der Helix 11 der LBD und ragt in die Ligandenbindungstasche hinein (Abbildung 61A). In der Kristallstruktur der PPAR α LBD nimmt die entsprechende Aminosäure H440 einen Abstand von 2,8 Å zum Agonisten bzw. 3,5 Å zum inversen Agonisten ein. Durch die Mutation zu einem Tryptophan ragt der Rest aufgrund des aromatischen Rings weiter in die Bindungstasche, so dass die Ligandenbindung sterisch blockiert wird (Abbildung 61B). Die verminderte Ligandenvermittelte Aktivierung und Repression in der Mutante H413A kann nicht durch eine solche sterische Behinderung der Ligandenbindung erklärt werden, da die kleine Aminosäure Alanin weniger weit aus der Helix herausragt als das Histidin. Der geringe Abstand von H413 zum Liganden legt eine Funktion für die Ligandenbindung nahe. Zoete *et al.* ^[324] beschrieben in diesem Zusammenhang eine Beteiligung der entsprechenden Aminosäure H440 in PPAR α an der Ausbildung eines Wasserstoffbrücken-Netzwerks um den Liganden AZ242. Durch die Mutation zu einem Alanin kann die Interaktion mit dem Liganden nicht mehr stattfinden, wodurch wahrscheinlich die Bindung des Liganden beeinträchtigt wird.

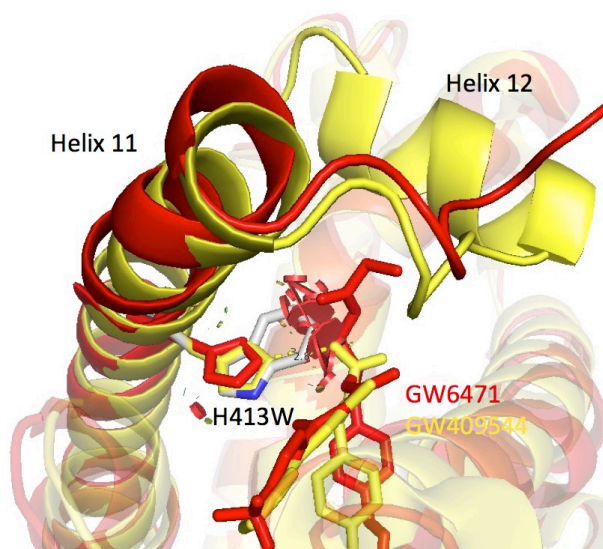


Abbildung 61: Sterische Behinderung der Ligandenbindung bei der Mutante H413W. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). Die Aminosäure H413 (entspricht H440 in PPAR α) ragt in die Ligandenbindungstasche und nimmt einen Abstand von 2,8 Å zum Agonisten bzw. 3,5 Å zum inversen Agonisten ein. Der aromatische Ring des Tryptophans (weiß) in der Mutante H413W behindert sterisch die Bindung der Liganden.

5.5.7 Die Mutanten V254A, R321A, R321K und I327A zeigen eine verminderte Repression durch den inversen Agonisten

Die Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 war, neben den bereits besprochenen Mutationen im C-Terminus, in den Mutanten R321A, R321K und I327 (und V254A) geschwächt. Bei den Mutationen R321A (schwächer V254A) und insbesondere I327A war parallel eine verstärkte basale Repression zu beobachten. In diesen Mutanten ist die Schwächung der Repression durch den inversen Agonisten nicht voll ausgeprägt und könnte durch das bereits niedrigere Transkriptlevel aufgrund der verstärkten basalen Repression erklärt werden. Die verstärkte basale Repression führt in der Mutante R321A den Erwartungen entsprechend zu einer leichten Steigerung der Aktivierung durch den Agonisten (unterhalb des Cutoffs). Bei der Mutante I327A ist jedoch eher eine Schwächung der Aktivierung durch den Agonisten zu verzeichnen (ebenfalls unterhalb des Cutoffs). Der niedrigere Aktivierungsfaktor trotz der verstärkten basalen Repression, weist darauf hin, dass die Aktivierung durch den Agonisten in dieser Mutante beeinträchtigt ist. In der Kristallstruktur wird ersichtlich, dass der hydrophobe Rest der Aminosäure Isoleucin an Position 327 in die Ligandenbindungstasche ragt (Abbildung 62). Dies legt eine Beteiligung an der Ausbildung der hydrophoben Interaktionsfläche für die Ligandenbindung nahe. Durch die Mutation zu einem Alanin könnte die Bindung der Liganden geschwächt werden. Wodurch es zur verstärkten basalen Repression kommt, lässt sich anhand der Kristallstrukturen nicht klären. Eventuell verändert sich die Tertiärstruktur durch die Mutation, und die Affinität zu Co-Repressoren wird bereits im unligierten Zustand erhöht.

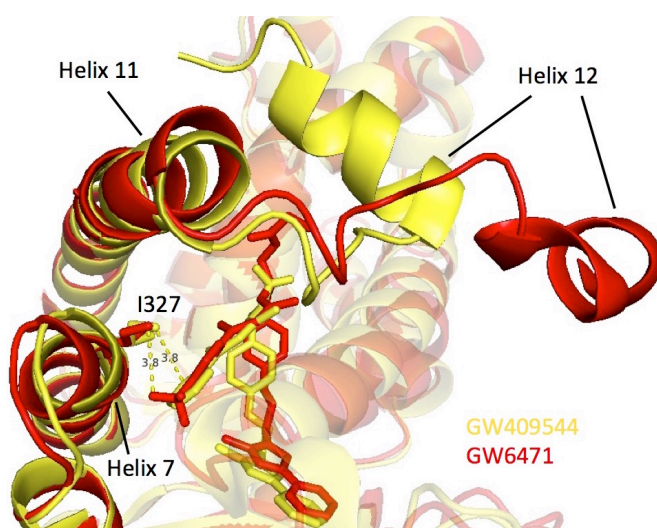


Abbildung 62: Die Aminosäure I327 ragt mit ihrem hydrophoben Rest in die Ligandenbindungstasche hinein. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). Die Aminosäure I327 ragt in die Bindungstasche und ist an der Bildung der hydrophoben Ligandenbindungstasche beteiligt. Durch die Mutation zu einem Alanin könnte die Bindung von Liganden geschwächt werden.

Bei der Mutation R321K war die basale Repression eher etwas geschwächt, sodass sich die Beeinträchtigung der Repression durch den inversen Agonisten nicht durch ein niedrigeres basales Transkriptlevel erklären lässt. Die Aktivierung durch den Agonisten war etwas vermindert

(unterhalb des Cutoffs). Aufgrund der leicht geschwächten basalen Repression ist es schwierig zu beurteilen, welcher Anteil der Beeinträchtigung durch das erhöhte Basallevel verursacht wird und ob darüber hinaus eine Störung der Aktivierung vorliegt. Das Arginin an Position 321 bildet mit seiner positiven Ladung eine Salzbrücke zu den negativ geladenen Glutamaten an den Positionen 240 und 424 aus (für PPAR γ in Lori *et al.* 2014 ^[164] beschrieben). Diese starken Interaktionen dienen der Verankerung der Loops zwischen den Helices 2' und 3, 6 und 7 sowie zwischen den Helices 11 und 12. Durch die Mutation des Arginins 321 zur zwar auch positiv geladenen, aber kürzeren Aminosäure Lysin vergrößert sich der Abstand zu den Glutamat-Resten 240 und 424, was zu einer Schwächung der Wechselwirkungen zwischen den Helices führen könnte. Die Mutation R321K könnte dazu führen, dass stattdessen Interaktionen mit anderen Aminosäuren stattfinden, die eine Konformationsänderung bewirken, welche die verstärkte Repression durch den inversen Agonisten beeinträchtigt. Die Kristallstrukturen der PPAR α LBD bei Bindung eines Agonisten bzw. eines inversen Agonisten zeigen, dass die Helix 7 bei der Bindung des inversen Agonisten (rot) etwas weiter von der Ligandenbindungstasche entfernt steht (Abbildung 63). Das führt dazu, dass sich die Entfernung zum Glutamat 424 bei der Mutation zu einem Lysin in der inversen Agonisten-gebundenen Konformation von 3,0 Å auf 4,9 Å vergrößert, während der Abstand in der Agonisten-gebundenen Konformation nur von 2,8 Å auf 4,2 Å ansteigt.

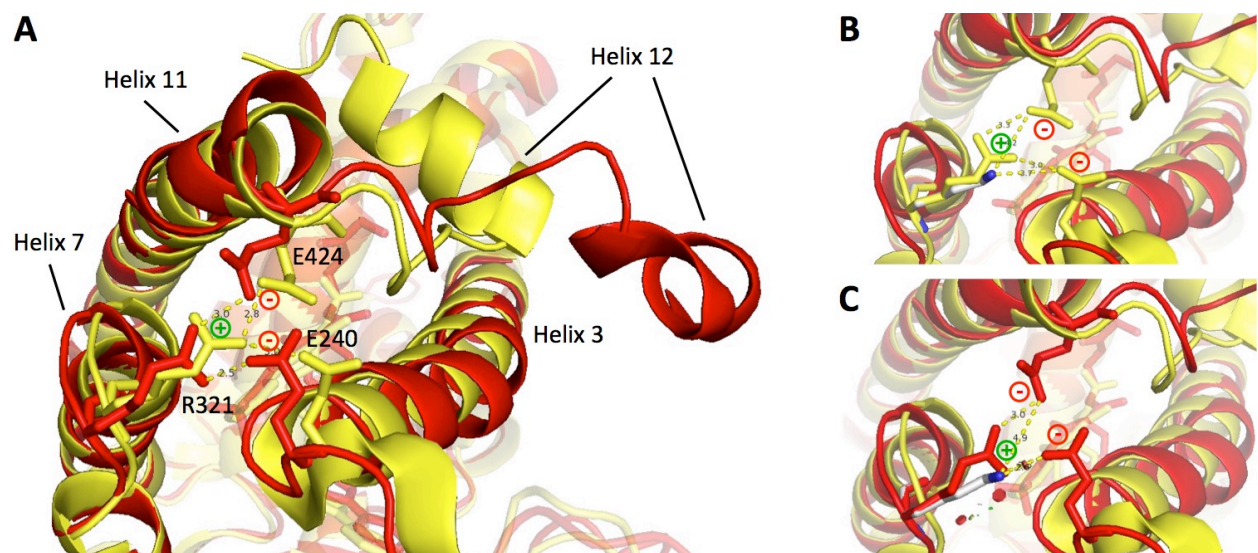


Abbildung 63: Wechselwirkungen zwischen R321, E240 und E424. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, nicht gezeigt). A) Das positive Arginin 321 (entspricht R348 in PPAR α) kann Salzbrücken mit den Glutamat-Resten 240 und 424 ausbilden und die Loops 2'/3, 6/7 und 11/12 aneinander verankern. B-C) Die Mutation von Arginin 321 zur zwar ebenfalls positiv geladenen, aber kürzeren Aminosäure Lysin führt zu größeren Abständen zu den Glutamat-Resten. Aufgrund der distaleren Positionierung der Helix 7 bei Bindung des inversen Agonisten (rot, C) fällt die Vergrößerung der Entfernung hier möglicherweise mehr ins Gewicht als bei der Bindung eines Agonisten (gelb, B).

Es wäre denkbar, dass die Wechselwirkungen zwischen den gegensätzlichen Ladungen daher bei der Bindung eines Agonisten noch ausreichend stark sind, während sie bei der Bindung des inversen Agonisten verloren gehen. Dieser Verlust könnte wiederum eine Konformationsänderung zur Folge haben, die verhindert, dass der Co-Repressor rekrutiert werden kann. Hinzu kommt, dass die distalere Position der Helix 7 bei der Bindung des inversen Agonisten wahrscheinlich durch den Druck des größeren Liganden zustande kommt, sodass bei dessen Bindung größere Kräfte auf die Verankerung der Helices wirken als bei der Bindung des Agonisten. Es bleibt bei diesen Überlegungen jedoch stets zu beachten, dass hier anhand der PPAR α -Strukturen mit PPAR α -Liganden interpretiert wird. Um zuverlässigere Aussagen zu treffen, wären die Kristallstrukturen von PPAR β/δ mit den verwendeten Liganden PT-S264 und L165,041 erforderlich.

Warum sich die Mutation von R321 zu einem Alanin anders auswirkt, ist fraglich. Es könnte spekuliert werden, dass das Lysin in der R321K andere Wechselwirkungen eingeht und so die Struktur stärker verändert als die Schwächung der Interaktionen durch die Mutation zu einem Alanin. Weiterhin verwundert es auf den ersten Blick, warum die Mutationen E240A und E424A keine ähnlichen Auswirkungen zeigen wie die Mutation R321K. Eine mögliche Erklärung wäre eventuell, dass durch die Mutation des Arginins die Verankerung zu beiden Loops (2'/3 und 11/12) geschwächt wird, während bei den Mutationen der Glutamate je nur die Verankerung eines der Loops gestört wird. Weiterhin könnten veränderte Interaktionen durch die R321K-Mutante und eine dadurch verursachte Konformationsänderung, die bei den anderen Mutationen nicht entsteht, zu den beobachteten Beeinträchtigungen beitragen.

5.5.8 Die Mutanten K421A, K421A-K422A und T427I zeigen einen Verlust der basalen Repression und verstärkte Repression durch PT-S264

Bei den Mutanten K421R, K421R-K422R und T427F wurde eine geschwächte basale Repression beobachtet. Sieben weitere Mutanten, die eine Beeinträchtigung der basalen Repression zeigten, wiesen zusätzlich eine verminderte Aktivierung durch den Agonisten auf, während der inverse Agonist jedoch weiterhin funktionierte. In den Mutanten K421A, K421A-K422A und T427I (schwächer auch R314A) war der Verlust der basalen Repression nahezu vollständig ausgeprägt und ging mit einer Verstärkung der Repression durch den inversen Agonisten einher. Diese Konstellation deutet darauf hin, dass die Mutationen eigentlich nur einen Verlust der basalen Repression zur Folge haben. Das dadurch erhöhte basale *ANGPTL4* Transkriptlevel vermindert das weitere Aktivierungspotential und erhöht gleichzeitig das Repressionspotential bei Behandlung mit einem inversen Agonisten. Bei den Mutanten K421R, K421R-K422R und T427F deutet sich dieses Muster in schwächerer Form ebenfalls an. Jedoch ist die Beeinträch-

tigung der basalen Repression weniger stark ausgeprägt und die Veränderungen der Regulation durch die Liganden verbleiben unterhalb des Cutoffs. Die Mutante E329A verhält sich etwas anders. Sie zeigte zwar eine starke Beeinträchtigung der basalen Repression, die wie in den anderen Mutanten mit einer Schwächung der Aktivierung durch den Agonisten einherging. Jedoch kommt es nicht im erwarteten Maße zu einer Verstärkung der Repression durch den inversen Agonisten. Möglicherweise hat diese Mutation also auch eine gewisse Beeinträchtigung dieses Regulationstyps zur Folge, was bei Betrachtung des Regulationsfaktors durch die verminderte basale Repression allerdings nicht direkt auffällt.

Die Aminosäuren Arginin an Position 314 in Helix 6 und Glutamat an Position 329 in Helix 7 (R341 und E356 in PPAR α) liegen in der Tertiärstruktur von PPAR β/δ in starker räumlicher Nähe. Dabei führen die gegensätzlichen Ladungen der beiden Aminosäuren zu einer gegenseitigen Anziehung der Reste, was auf eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Tertiärstruktur schließen lässt (Abbildung 64).

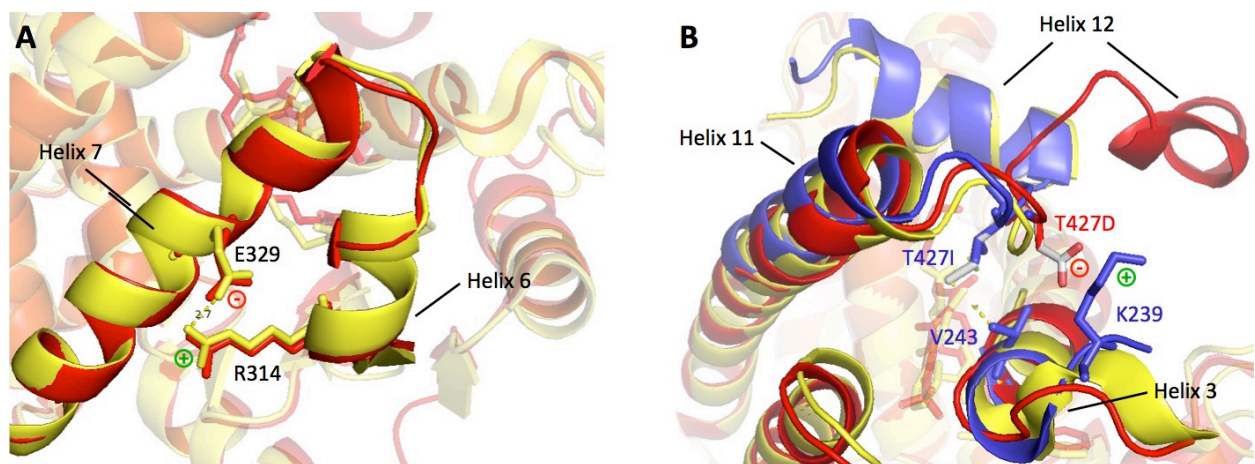


Abbildung 64: Stabilisierung der Tertiärstruktur durch R314 und mögliche Auswirkungen der Mutationen T427I und T427D. Kristallstrukturen der PPAR α LBD aus Abbildung 39, die Sekundärstrukturelemente der PPAR β/δ LBD stimmen nahezu perfekt überein (PDB ID 3TKM, blau in B). A) Die gegensätzlich geladenen Aminosäuren R314 (entspricht R341 in PPAR α) und E329 (entspricht E356 in PPAR α) ziehen die Helices 6 und 7 zueinander, was eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Tertiärstruktur vermuten lässt. B) Die Aminosäure-Position 427 wird in PPAR β/δ (blau) von einem Threonin eingenommen, während an der entsprechenden Position 454 in PPAR α ein Alanin sitzt. Durch die Mutation T427I kam es zu einem Verlust der basalen Repression, während die *phospho-mimic* Mutante T427D eine verstärkte basale Repression aufwies. Das Isoleucin könnte hydrophobe Wechselwirkungen mit Resten in Helix 3 eingehen und so die Helix 12 im unligierten Zustand am Herausschwingen hindern. T427D könnte hingegen eine Salzbrücke mit dem positiv geladenen Lysin 239 ausbilden und somit die Helix 12 im unligierten Zustand in der herausgeklappten Konformation halten. Dadurch wäre die Interaktionsoberfläche für Co-Repressoren dauerhaft freigegeben und die Affinität könnte bereits im unligierten Zustand des Rezeptors erhöht sein.

Das Ersetzen von einer der Aminosäuren durch ein Alanin verhindert die zuvor beschriebene Interaktion. Eine mögliche Folge ist eine leichte Veränderung der Tertiärstruktur, die scheinbar allerdings so gering ausfällt, dass nur die basale Repression, nicht aber die Liganden-vermittelten Effekte in Mitleidenschaft gezogen sind. Es wäre denkbar, dass die Bindung eines Liganden die Struktur des Kernrezeptors stabilisiert, sodass die Mutationen nach der Ligandenbindung weniger stark ins Gewicht fallen als beim unligierten Rezeptor. Ersetzt man das Arginin durch die ebenfalls positiv geladene und außerdem sehr ähnlich aufgebaute Aminosäure Lysin (R314K), so kommt es nicht zu den in R314A beobachteten Beeinträchtigungen.

Die Aminosäure-Position 427 wird in PPAR β/δ von einem Threonin eingenommen, welches durch eine Phosphorylierung modifiziert werden könnte. In PPAR α sitzt an der entsprechenden Position 454 ein Alanin, während an Position 464 in PPAR γ ein Methionin zu finden ist. Durch die Mutation T427I kam es zu einem Verlust der basalen Repression, während die *phospho-mimic* Mutante T427D eine verstärkte basale Repression aufwies. Das Isoleucin könnte hydrophobe Wechselwirkungen mit Resten in Helix 3 eingehen und so die Helix 12 im unligierten Zustand am Herausschwingen hindern, sodass die Interaktionsoberfläche für Co-Repressoren verdeckt bleibt (Abbildung 64B). Da die Repression durch den inversen Agonisten weiterhin funktioniert, scheint der Druck des Liganden gegen die Helix stark genug zu sein, um diese hydrophoben Wechselwirkungen aufzubrechen und die Helix in die distale Position zu verlagern. Die Interaktionsoberfläche würde dadurch freigegeben werden und Co-Repressoren könnten binden. T427D könnte hingegen eine Salzbrücke mit dem positiv geladenen Lysin 239 ausbilden und somit die Helix 12 im unligierten Zustand in der herausgeklappten Konformation halten (Abbildung 64B). Dadurch wäre die Interaktionsoberfläche für Co-Repressoren dauerhaft freigegeben und die Affinität könnte bereits im unligierten Zustand des Rezeptors erhöht sein. Es wäre denkbar, wenn auch rein spekulativ, dass das phosphorylierbare Threonin an Position 427 in PPAR β/δ eine Schlüsselrolle bei der basalen Repression übernimmt. Wie bereits angesprochen, wird die entsprechende Position in PPAR α und PPAR γ von den hydrophoben Aminosäuren Alanin bzw. Methionin eingenommen. Beim Vergleich der C-Termini der drei PPAR-Subtypen fällt auf, dass der Aufbau an den überwiegenden Aminosäure-Positionen identisch oder zumindest, bezogen auf die Eigenschaften der Aminosäuren, sehr ähnlich ist (Abbildung 65).

		H11											H12													
PPAR α	445	Q	I	I	K	K	T	E	S	D	A	A	L	H	P	L	L	Q	E	I	Y	R	D	M	Y	468
PPAR β/δ	418	Q	R	I	K	K	T	E	T	E	T	S	L	H	P	L	L	Q	E	I	Y	K	D	M	Y	441
PPAR γ	454	Q	V	I	K	K	T	E	T	D	M	S	L	H	P	L	L	Q	E	I	Y	K	D	L	Y	477

Abbildung 65: Vergleich der C-Termini der drei PPAR-Subtypen. Sequenz-Alignment der drei PPAR-Kernrezeptoren (Ausschnitt aus Abbildung 35). Die C-Termini der PPARs sind an den einzelnen Aminosäure-Positionen überwiegend identisch oder zumindest ähnlich aufgebaut. Größere Unterschiede fallen an den PPAR β/δ Positionen 419 und 427 auf (schwarze Rahmen).

Die stärksten Unterschiede finden sich an den PPAR β/δ Positionen 419 und 427. PPAR β/δ zeigt bezüglich der basalen Repression einzigartige Eigenschaften im Vergleich zu den anderen beiden PPAR-Subtypen (Kapitel 1.2.1) ^[259, 319]. Der C-Terminus der PPARs spielt zweifelsohne eine wichtige Rolle für den Wechsel zwischen der Bindung von Co-Repressoren und Co-Aktivatoren. Unterschiede in diesem Bereich der Proteine könnten somit für die besondere Funktion von PPAR β/δ entscheidend sein.

Für die Doppel-Mutante K421A-K422A wird anhand der später untersuchten Einzelmутanten klar, dass der Verlust der basalen Repression vollständig durch die Mutation von Lysin 421 zu Alanin zustande kommt. Die Mutation des nachfolgenden Lysins 422 hatte keine Auswirkungen. Lysine tragen eine positive Ladung und können durch Acetylierungen modifiziert werden. Bei der Mutation zu einem Alanin könnte sowohl der Verlust der positiven Ladung als auch der Verlust der Modifikationsmöglichkeit für den beobachteten Effekt verantwortlich sein. Daher wurden zusätzlich Mutanten mit der ebenfalls positiv geladenen und ähnlich aufgebauten Aminosäure Arginin generiert, in denen keine Acetylierung des Restes stattfinden kann. In den Mutanten K421R und K421R-K422R treten die zuvor in den Alanin-Mutanten beobachteten Auswirkungen in abgeschwächter Form auf. Anhand dieser Ergebnisse erscheint es zwar denkbar, dass die Acetylierung von K421 eine Rolle spielt. Da die Beeinträchtigung jedoch schwächer ausfällt als in der Alanin-Mutante, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob der Verlust der Ladung oder der Modifikationsmöglichkeit ursächlich ist. Bei Betrachtung der C-Termini der drei PPAR-Subtypen, fällt auf, dass K421 in PPAR β/δ innerhalb eines Kernrezeptor-Acetylierungsmotivs (Konsensus (R/K)XKK ^[291]) liegt (Abbildung 65). In PPAR α und PPAR γ fehlt das Arginin am Beginn der Konsensus-Sequenz. Es ist zwar erneut sehr spekulativ, aber möglicherweise kann an K421 nur in PPAR β/δ (im Gegensatz zu PPAR α und PPAR γ) eine Acetylierung auftreten, die für die basale Repression erforderlich ist.

5.5.9 Fazit zum funktionellen Screen von PPAR β/δ Mutanten

Zusammenfassend lassen sich aus dem funktionellen Screen die folgenden Erkenntnisse, Hinweise und Hypothesen über den Bindungsmodus der verwendeten Liganden und über die transkriptionelle Regulation durch PPAR β/δ ableiten. Die Auflösung von Kristallstrukturen der PPAR β/δ LBD bei Bindung der Liganden, insbesondere bei der Bindung von inversen Agonisten, ist von großer Bedeutung, um die Hypothesen und Hinweise auf ihre Korrektheit zu überprüfen. Einige der generierten Mutanten könnten in der Zukunft nützlich sein, um sowohl die transkriptionelle Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten als auch die transkriptionelle Aktivierung durch PPAR β/δ Agonisten weiter zu untersuchen.

- 1) Die Daten des Screens weisen darauf hin, dass sowohl L165,041 als auch PT-S264 in die Ligandenbindungstasche von PPAR β/δ binden.
 - In der Mutante H413W ragt die voluminösere Aminosäure Tryptophan in die Ligandenbindungstasche und scheint die Bindung beider Liganden zu verhindern.
- 2) Anhand der Daten erscheint es plausibel, dass die Bindung von PT-S264 an PPAR β/δ ähnliche Auswirkungen hat wie die Bindung des inversen PPAR α Agonisten GW6471 an PPAR α : Ein verlängerter Arm des Liganden drückt gegen die Helix 12 in der aktiven Konformation und bewirkt so ein Herauskappen der Helix, was zur Freigabe der Interaktionsoberfläche für Co-Repressoren und deren verstärkten Rekrutierung führt.
 - Die Mutation L429A führte im Screen unter anderem zum Verlust der Repression durch den inversen Agonisten. In den Kristallstrukturen von PPAR α würde das entsprechende Leucin in der aktiven Konformation sehr nahe am verlängerten Arm des inversen Agonisten GW6471 stehen. Möglicherweise ist diese sterische Behinderung für das Herausdrücken der Helix 12 durch den inversen Agonisten erforderlich. Diese Funktion würde durch die Mutation zu einem Alanin verloren gehen.
 - Ähnliches war bei der Mutante Y437A zu beobachten. Das entsprechende Tyrosin würde gemäß den PPAR α Strukturen ebenfalls mit dem verlängerten Arm des inversen Agonisten GW6471 kollidieren. Dass die Mutation zu einem Alanin auch hier zur Beeinträchtigung der Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 führt, deutet darauf hin, dass der PPAR β/δ Ligand ebenfalls durch sterische Behinderungen dieses Restes die Helix 12 aus der aktiven Konformation drückt.
 - Anhand der Δ AF2 und Δ L-Box+AF2 Mutanten wird ersichtlich, dass die Helix 12 nicht für die Repression durch den inversen Agonisten erforderlich ist. Stattdessen ist es wahrscheinlich nötig, sie aus der aktiven Konformation herauszudrücken um die Interaktionsoberfläche für Co-Repressoren freizugeben. Für die Erhöhung der Affinität zu den Co-Repressoren scheinen jedoch noch weitere Konformationsänderungen eine Rolle zu spielen, andernfalls müsste in diesen Mutanten eine verstärkte basale Repression zu beobachten sein.
- 3) Die Ergebnisse des Screens weisen darauf hin, dass die Bindungsoberflächen der durch L165,041 rekrutierten Co-Aktivatoren mit der Bindungsoberfläche der durch PT-S264 rekrutierten Co-Repressoren überlappt. Es erscheint plausibel, dass die Bindung über ein LXXLL (Aktivatoren) bzw. eine CoRNR-Box (Repressoren) erfolgt.
 - Die Mutationen V257R, T261R und V279R führten zu einem Verlust beider Ligandenvermittelter Regulationstypen durch PPAR β/δ . In den Kristallstrukturen von PPAR α ist erkennbar, dass die Mutationen an den entsprechenden Resten zu sterischen Behinderungen für die gebundenen Co-Regulator Peptide führen würden und die hydro-

phobe Interaktionsfläche stören. Das Peptid in der inverse Agonisten gebundenen Form ist ein SMRT-Fragment, das eine CoRNR-Box enthält. In der Agonisten-gebundenen Form bindet ein Peptid des Co-Aktivators SRC1, das ein LXXLL-Motiv enthält.

- 4) Ein Großteil des aktivierenden Effektes des PPAR β/δ Agonisten L165,041 scheint im betrachteten Zellmodell faktisch aus der Aufhebung der basalen Repression zu resultieren (Derepression). Nur ein geringer Anteil ist auf die Wirkung von möglicherweise rekrutierten Co-Aktivatoren zurück zu führen.
 - Der Verlust der basalen Repression ging in der Regel auch mit einer Schwächung der Aktivierung durch den Agonisten einher.
 - Eine Verstärkung der basalen Repression ermöglichte häufig eine stärkere „Aktivierung“ durch den Agonisten (Aktivierungsfaktor relativ zur Lösungsmittel-Kontrolle). Ausnahmen sind Mutanten, die zusätzlich einen Einfluss auf das Einnehmen der aktiven Konformation von Helix 12 hatten oder zu generellen Defekten von PPAR β/δ führten.
 - Beim vollständigen Verlust der basalen Repression in den Mutanten K421A, K421A-K422A und T427I war mit dem Agonisten nur noch eine 3,3-fache Aktivierung im Vergleich zur 19,8-fachen Aktivierung im Wildtyp zu erzielen. In diesen Mutanten fehlt der Effekt der Derepression.
 - In den ChIP-MS Daten konnten keine bekannten Co-Aktivatoren als spezifische Interaktoren von PPAR β/δ bei Bindung des Agonisten L165,041 in MDA-MB231-*luc2* Zellen detektiert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass zumindest nicht in großem Maße Co-Aktivatoren rekrutiert werden. Andere Erklärungen sind jedoch ebenfalls denkbar und die Beobachtung könnte durch die technischen Grenzen der Methode begründet sein.
- 5) Die Daten des Screens weisen darauf hin, dass die basale Repression und die Repression durch den inversen Agonisten über die Rekrutierung derselben Co-Repressoren vermittelt wird. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit generierten ChIP-Daten, scheint der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 die Affinität zu diesen Co-Repressoren (NCoR, SMRT) zu erhöhen.
 - Eine verstärkte basale Repression der Mutanten führte im funktionellen Screen in der Regel zu einer Schwächung der Repression durch den inversen Agonisten.
 - Weiterhin führte der Verlust der basalen Repression (K421A, K421A-K422A und T427I) zu einer verstärkten Repression durch den inversen Agonisten (Repressionsfaktor relativ zur Lösungsmittel-Kontrolle). Ausnahmen waren Mutationen, die einen generellen Funktionsverlust von PPAR β/δ zur Folge hatten oder wahrscheinlich die Bindung der Co-Repressoren blockieren (V257R, T261R, V279R)

5.6 Charakterisierung von PPAR β/δ Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression

5.6.1 Der Verlust der basalen Repression führt zu einer verstärkten Repression durch den inversen Agonisten

Die Mutanten R314A, T427I und K421A-K422A zeigten einen Verlust der basalen Repression, was ein erhöhtes basales *ANGPTL4* Transkriptlevel zur Folge hatte. Es wurde ein, im Vergleich zu mit PPAR β/δ Wildtyp rekonstituierten Zellen, signifikant erhöhter Repressionfaktor durch den inversen Agonisten gemessen. Bei der Kombinationsbehandlung mit TGF β_1 und PT-S264 setzte sich dies nur in abgeschwächter Form fort. Warum die Verstärkung der Repression durch den inversen Agonisten in Anwesenheit von TGF β_1 weniger ausgeprägt ist, lässt sich nur schwer mit Bestimmtheit feststellen. Auffällig ist, dass TGF β_1 das *ANGPTL4* Transkriptlevel in den Mutanten relativ zur Lösungsmittelkontrolle nicht um denselben Faktor steigern konnte wie im Wildtyp. Eventuell könnte hier das generell erhöhte Basallevel in den Mutanten eine Rolle spielen.

Die Aktivierung durch den PPAR β/δ -Agonisten L165,041 war in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression deutlich vermindert. Der Aktivierungsfaktor fiel von ca. 20-fach auf 3- bzw. 5-fach (zum Vergleich TGF β_1 : von ca. 7,6-fach auf 3- bzw. 4-fach). Wie bereits in Kapitel 5.5.9 erläutert wurde, kann aus dieser Beobachtung geschlossen werden, dass ein Großteil des aktivierenden Effektes des Agonisten durch die Aufhebung der basalen Repression (Derepression) zustande kommt. Diese Komponente fehlt in den Mutanten, die keine basale Repression aufweisen. Dass die Schwächung der Aktivierung durch den Agonisten deutlich ausgeprägter ist als bei TGF β_1 deutet darauf hin, dass sie nicht alleine in der Erhöhung des Basallevels begründet liegt.

5.6.2 Die Rekrutierung von NCoR, SMRT und HDAC3 wird durch den inversen Agonisten wiederhergestellt

In den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression war die Bindung von NCoR, SMRT und HDAC3 im Basalzustand im Vergleich zu den mit PPAR β/δ Wildtyp rekonstituierten Zellen verringert. Als Kontrolle wurde mittels ChIP-qPCR nachgewiesen, dass die Mutanten weiterhin an DNA binden (Anhang, Abb. Z5). Die Korrelation des Verlustes der basalen Repression mit dem Verlust der Bindung von NCoR/SMRT-Komplexkomponenten weist darauf hin, dass die basale Repression durch diese Co-Repressoren vermittelt wird. Durch den inversen PPAR β/δ -

Agonisten PT-S264 konnte die Rekrutierung der Komplex-Untereinheiten wiederhergestellt werden. Dabei wurde ein vergleichbares Niveau erreicht wie in den Wildtyp Zellen nach der PT-S264 Behandlung. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass der Verlust der basalen Repression auf Ebene der transkriptionellen Repression vollständig durch PT-S264 kompensiert werden konnte und dass darüber hinaus weiterhin eine verstärkte Repression durch PT-S264 festgestellt wurde. Zusammenfassend stützen die Daten die aufgestellte Hypothese, wonach sowohl die basale Repression als auch die verstärkte Repression durch den inversen PPAR β/δ -Agonisten PT-S264 über NCoR/SMRT-Komplexe vermittelt wird. Der inverse Agonist führt zu einer verstärkten Rekrutierung der Co-Repressoren im Vergleich zum unligierten Rezeptor, die vermutlich aus einer Affinitätssteigerung aufgrund einer durch den Liganden induzierten Konformationsänderung resultiert.

In den mit dem Leervektor transduzierten Zellen fiel das Level der NCoR- und SMRT-Bindung auf das Niveau der L165,041 behandelten Zellen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die in den *PPARD* KO Zellen verstärkt an die PPRES bindenden PPAR-Subtypen α und γ keine Kompensation der Co-Repressor Rekrutierung bewirken. Das ist in Übereinstimmung mit Hinweisen aus der Literatur, wonach unligiertes PPAR α und PPAR γ die Interaktion mit NCoR verlieren, wenn sie an DNA binden (Kapitel 1.2.1) ^[259, 319].

5.6.3 Die Senkung der RNA-Polymerase II Rekrutierung wird durch den inversen Agonisten wiederhergestellt

In den mit dem Leervektor transduzierten 2B3 Zellen kam es zur erhöhten Rekrutierung der RNA-Polymerase II zu den Transkriptionsstarts von PPAR β/δ -Zielgenen. Diese konnte durch die Transduktion der MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPARD* KO Zellen mit PPAR β/δ Wildtyp tragenden Retroviren unterdrückt werden. Das steht im Einklang mit der Wiederherstellung der von PPAR β/δ vermittelten basalen Repression der Zielgen-Transkription und der Rekrutierung der Co-Repressoren NCoR, SMRT und HDAC3 im Basalzustand. Der in den Mutanten festgestellte Verlust der Bindung von NCoR, SMRT und HDAC3 im Basalzustand (Kapitel 5.6.2) korrelierte mit einer gegenüber dem Wildtyp verstärkten Rekrutierung der Polymerase zum Transkriptionsstart der PPAR β/δ Zielgene. Bei der Behandlung mit dem inversen Agonisten führte die wiederhergestellte Rekrutierung der Co-Repressoren in den Mutanten erwartungsgemäß zur deutlichen Senkung der RNA-Polymerase II Rekrutierung. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Rekrutierung der RNA-Polymerase II zu den Transkriptionsstarts von PPAR β/δ -Zielgenen sowohl im Basalzustand als auch in Anwesenheit von PT-S264 negativ mit der Rekrutierung der Co-Repressoren NCoR, SMRT und HDAC3 zu den PPRES korreliert. Dies weist darauf hin,

dass NCoR und SMRT sowohl die basale Repression als auch die PT-S264 abhängige Repression vermitteln, indem sie die Rekrutierung der RNA-Polymerase zu den Zielgenen limitieren. Die Rekrutierung der RNA-Polymerase zum Transkriptionsstart von *TSC22D3*, welches kein PPAR-Zielgen ist, blieb von der kodierten PPAR β/δ cDNA und von PT-S264 unbeeinflusst. Außerdem zeigte die Behandlung mit PT-S264 keinen Effekt in den 2B3 *PPARD* KO Zellen, die mit dem Leervektor transduziert wurden. Beide Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Effekte von PT-S264 von PPAR β/δ abhängig sind.

5.7 Überprüfung der Abhängigkeit von der Deacetylase-Aktivität

Beim Vergleich der basalen Transkriptlevel in MDA-MB231-*luc2* und 2B3 *PPARD* KO Zellen fiel besonders für *ANGPTL4* ein starker Anstieg in den *PPARD* KO Zellen auf (von Ct 28,4 auf Ct 25,8). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die basale Repression durch PPAR β/δ am Zielgen *ANGPTL4* im Vergleich zu anderen Zielgenen besonders stark ausgeprägt ist.

Die Inhibition von Deacetylase-Aktivität durch TSA und Apicidin führte in den MDA-MB231-*luc2* an allen betrachteten Genen zu einem Anstieg des Transkriptlevels. Anhand des Anstiegs der Transkriptlevel in den *PPARD* KO Zellen lässt sich ablesen, welcher Anteil der durch die HDAC-Inhibitoren vermittelten Derepression mit PPAR β/δ in Zusammenhang steht. Es deutet sich an, dass der Effekt bei *ANGPTL4* nahezu vollständig von PPAR β/δ abhängig ist. Bei den Zielgenen *PDK4* und *PLIN2* kam es auch in den *PPARD* KO Zellen durch die Inhibition von HDACs noch zu deutlichen Anstiegen der Transkriptlevel. Das weist darauf hin, dass hier HDACs inhibiert werden, die unabhängig von PPAR β/δ rekrutiert werden. Gleiches war bei *TSC22D3* zu beobachten, welches kein PPAR β/δ -Zielgen ist.

Die durch PPAR β/δ vermittelte basale Repression der *ANGPTL4* Transkription wurde durch die HDAC-Inhibitoren TSA und Apicidin in den MDA-MB231-*luc2* Zellen weitestgehend aufgehoben. Es ist jedoch nicht ganz eindeutig festzustellen, ob ein gewisser Deacetylase-unabhängiger repressiver Effekt verbleibt. Der basale Ct-Wert stieg in den *PPARD* KO Zellen um 2,6. Würde man diesen Wert zugrunde legen, so sollte sich bei einer vollständigen Derepression ein ca. 6-fach erhöhtes Transkriptlevel ergeben. Bei der Behandlung mit TSA bzw. Apicidin stieg das Transkriptlevel jedoch nur auf ca. 3-fach an. Dies könnte ein Hinweis auf einen Deacetylase-unabhängigen Anteil bei der basalen Repression sein.

In den mit Wildtyp PPAR β/δ rekonstituierten 2B3 *PPARD* KO Zellen war die Repression durch den inversen Agonisten schwächer als in der Parentalzelllinie MDA-MB231-*luc2*. Dies wurde bereits in Kapitel 4.4.3 beobachtet und entsteht wahrscheinlich durch die Überexpression von PPAR β/δ und eine limitierte Verfügbarkeit von Co-Repressoren. Während das *ANGPTL4* Transkriptlevel in den mit PPAR β/δ Wildtyp transduzierten Zellen durch die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren anstieg, war dies in den Mutanten ohne basale Repression (bis auf eine Ausnahme) nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der Anstieg des *ANGPTL4* Transkriptlevels im Wildtyp aufgrund der Beeinträchtigung der wohl zum Großteil Deacetylase-abhängigen basalen Repression zustande kommt. Da die Mutanten keine basale Repression ausüben, entsteht durch die Inhibition von Deacetylase-Aktivität kein Anstieg des Transkriptlevels relativ zur Lösungsmittel-Kontrolle. Genauer gesagt kommt dieser Anstieg bereits ohne die HDAC-Inhibitoren aufgrund des Verlustes der basalen Repression zustande, sodass das basale Transkriptlevel bereits in der Lösungsmittel-Kontrolle erhöht ist (Ct 25,4 bzw. 25,8 gegenüber 28,2 in Wildtyp rekonstituierten Zellen).

Die Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 war in den mit PPAR β/δ Wildtyp transduzierten Zellen teilweise sensitiv gegenüber den HDAC-Inhibitoren. Sie wurde jedoch nicht vollständig aufgehoben. Unter Betrachtung der Veränderung des Repressionsfaktors scheint die Repression durch den inversen Agonisten in den Mutanten ohne basale Repression sensitiver gegenüber HDAC-Inhibitoren zu sein als in den mit PPAR β/δ Wildtyp transduzierten Zellen (WT: von 8x auf 5x mit TSA bzw. 7x mit Apicidin; T427I: von 25x auf 7x mit TSA bzw. 12x mit Apicidin). Wie zuvor in Kapitel 4.6.1 beobachtet, wird in den Mutanten in Anwesenheit des inversen Agonisten die basale Repression sozusagen wiederhergestellt und um den eigentlichen Effekt des Liganden ergänzt. Die scheinbar größere Sensitivität der Repression durch den inversen Agonisten gegenüber HDAC-Inhibitoren in den Mutanten (im Vergleich zu PPAR β/δ Wildtyp transduzierten Zellen) könnte daher darauf hinweisen, dass die basale Repression stärker von Deacetylase-Aktivität abhängt als der eigentliche Effekt durch den Liganden. Somit könnte die Deacetylase-Aktivität von HDAC3 zwar zum Teil für die basale Repression verantwortlich sein, während sie jedoch nicht hinreichend ist für die gegenüber aktivierenden Stimuli dominante Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten.

Weder TSA noch Apicidin konnten die transkriptionelle Repression durch den inversen PPAR β/δ Agonisten vollständig aufheben. Allerdings wurde die Repression durch die HDAC-Inhibitoren geschwächt. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die von PPAR β/δ rekrutierten NCoR/SMRT-Komplexe sowohl Deacetylase-abhängige als auch Deacetylase-unabhängige Repressionsfunktionen auf die Transkription von PPAR β/δ Zielgenen ausüben. Die katalytische Aktivität von HDAC3 trägt zwar zur Repression bei, ist allerdings alleine nicht ausreichend für eine vollständige Repression.

5.8 Ansätze zum Nachweis eines funktionellen Zusammenhangs mit NCoR/SMRT-Komplexen

5.8.1 Mittels CRISPR/Cas9 konnte kein *Knockout* von *NCOR1* in MDA-MB231-*luc2* Zellen generiert werden

Im *in vitro* RNP-Test konnte gezeigt werden, dass die Cas9 Nuklease zumindest *in vitro* mit allen drei verwendeten *NCOR1* crRNAs funktionell ist und ein *NCOR1* DNA-Fragment, das die Erkennungssequenzen enthält, erfolgreich spalten kann. Nach der Transfektion der RNP-Komplexe konnte in den Zellen die ATTO™ 550 gelabelte tracrRNA in Form einer roten Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies deutet auf die erfolgreiche Aufnahme der RNP-Komplexe hin. Jedoch ist nicht völlig auszuschließen, dass die RNP-Komplexe nicht erfolgreich gebildet wurden und nur die RNA in die Zellen gelangt ist.

In drei unternommenen Ansätzen mit insgesamt über 250 Einzelklonen, die zunächst das 48-well Format erreichten und ca. 90 im Western Blot getesteten Klonen konnte mittels CRISPR/Cas9 leider kein *Knockout* von *NCOR1* in MDA-MB231-*luc2* Zellen erzielt werden. Dafür sind mehrere Ursachen denkbar. Trotz der Funktionalität der RNP-Komplexe *in vitro* könnte die Spaltung der *NCOR1* DNA *in vivo* möglicherweise nicht funktionieren, z. B. da die Erkennungssequenz der crRNAs nicht zugänglich ist. Hierbei zeigt sich ein Schwachpunkt bei der Wahl der crRNAs, deren Erkennungssequenzen sich überschneiden. Anzumerken ist auch, dass in den Händen unserer Arbeitsgruppe mit der RNP-basierten Methode bisher auch für zwei andere Gene im Rahmen zweier Masterarbeiten leider kein *Knockout* erzielt werden konnte. Somit gibt es in unserem Labor bisher kein Beispiel für einen erfolgreichen Einsatz dieser Methode. Der *PPARD Knockout* in der eigenen Masterarbeit wurde mit einer zuvor eingesetzten Plasmid-basierten Methode generiert ^[155]. Angesichts der hohen Verlustrate von Klonen (durch Absterben oder Proliferationsstopp) besonders am Beginn der Expansion erscheint allerdings eine andere Erklärung wahrscheinlicher. MDA-MB231-*luc2* weisen eine deutlich höhere Proteinexpression von NCoR1 auf als zum Beispiel Caki-1 Zellen (eigene Beobachtung Western Blot, Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind MDA-MB231-*luc2* in gewisser Weise von NCoR1 abhängig, sodass die Klone mit einem erfolgreichen *NCOR1 Knockout* in kurzer Zeit absterben oder aufhören zu proliferieren. NCoR übernimmt wichtige Funktionen im Zellzyklus und für die Genomstabilität ^[27, 316]. Ein möglicher Ansatz für die Zukunft anstelle eines *Knockouts* wäre die Veränderung der Rezeptor-Interaktionsdomänen oder der SANT-Domänen am endogenen Locus mittels *Genome Editing*. Damit ließe sich die Funktion bestimmter Domänen für die transkriptionelle Repression untersuchen. Zusätzlich ließe sich das Problem einer zu starken ekto-pischen Expression umgehen. Auf vergleichbare Weise könnte bei SMRT vorgegangen werden.

5.8.2 Das dominant-negative NCoR1-Fragment (dnNCoR1) konnte nicht exprimiert werden

In den transduzierten bzw. transfizierten MDA-MB231-*luc2* Zellen konnte im Western Blot keine Expression des dnNCoR1-Fragments detektiert werden. Mit den retroviralen Vektoren ist auch nach einer transienten Transfektion in HEK293 keine Expression messbar. Lediglich mit dem stärkeren, CMV-getriebenen Vektor pcDNA3.1 ist eine Expression auf Proteinebene zu sehen, die im Vergleich zu pMSCVbsd-3xFLAG-PPARD allerdings extrem schwach ausfällt. Da das dnNCoR1-Fragment nicht erfolgreich exprimiert werden konnte, erscheinen die Ergebnisse der RT-qPCRs, die keine Beeinträchtigung der transkriptionellen Repression durch PT-S264 zeigten, plausibel. Aufgrund der Expressionsprobleme führte der Ansatz nicht zu den erhofften Erkenntnissen und wurde nicht weiterverfolgt. Die RNAi-Experimente in Adhikary *et al.* 2013 deuten darauf hin, dass bei Bindung eines inversen Agonisten aufgrund der gesteigerten Affinität bereits eine relativ geringe Menge von in der Zelle verfügbaren Co-Repressoren ausreicht, um die Repression zu vermitteln. Somit müsste wahrscheinlich eine relativ große Menge des dnNCoR1-Fragments exprimiert werden, um deutliche Beeinträchtigungen zu bewirken.

5.8.3 Die PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionsproteine konnten in den MDA-MB231-*luc2* 2B3 PPARD KO Zellen kaum exprimiert werden

Die PPAR β/δ -NCoR/SMRT Fusionsproteine wurden in den MDA-MB231-*luc2* 2B3 PPARD KO Zellen nur sehr schwach exprimiert. Wahrscheinlich ist diese schwache Expression die Erklärung dafür, dass sich die mit den Fusionskonstrukten transduzierten Zellen in der RT-qPCR ähnlich wie der Leervektor oder die DNA-Bindungsmutante C91A-E92A verhielten. Sie zeigten keine basale Repression und keine Regulation durch PT-S264. Weiterhin wurde gemäß der Hypothese erwartet, dass zumindest die PPAR β/δ -NCoR Fusionskonstrukte eine dominant-reprimierende Wirkung gegenüber der Aktivierung durch TGF β_1 zeigen. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Aufgrund der schlechten Expression der Fusionsproteine lässt sich leider nicht feststellen, ob sich die Fusionskonstrukte bei ausreichendem Expressionslevel gemäß der Erwartungen verhalten würden, die sich aus der aufgestellten Hypothese ergeben.

In HEK293 Zellen konnte nach einer transienten Transfektion eine deutliche Expression der Fusionskonstrukte auf Proteinebene detektiert werden. Somit sind die klonierten Fusionskonstrukte prinzipiell in Hinsicht auf eine Exprimierbarkeit funktionell. HEK293 Zellen weisen eine deutlich höhere Transfektionseffizienz auf als MDA-MB231-*luc2* Zellen, sodass in ersteren eine transiente Transfektion durchgeführt werden konnte. Für die MDA-MB231-*luc2* Zellen war

hingegen eine Selektion erforderlich um genügend Zellen anzureichend, die die Konstrukte aufgenommen haben. Möglicherweise wird die eingebrachte cDNA der Fusionskonstrukte im Verlauf der Selektion stillgelegt, da die Fusionsproteine den Zellen schaden. Eine weitere Erklärung für die schwache Expression wäre, dass die Fusionsproteine in diesen Zellen instabil sind. Die HEK293 Zellen sind selbst leider nicht sehr gut für die Untersuchung des Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten geeignet. Zum einen ist das Modell-Zielgen *ANGPTL4* in diesen Zellen deutlich schwächer exprimiert als in MDA-MB231-*luc2* Zellen und die Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten ist nur schwach ausgeprägt. Zum anderen stehen uns keine HEK293 *PPARD* KO Zellen zur Verfügung, sodass die Fusionsproteine mit dem endogen vorhandenen PPAR β/δ konkurrieren müssten. Zusammenfassend erscheint es aufgrund der Expressionsprobleme unwahrscheinlich, dass sich die Fragestellungen, die sich aus der aufgestellten Hypothese ergeben, mit diesem Ansatz beantworten lassen. Daher wurde der Ansatz nicht weiter verfolgt und es wurden keine weiteren Konstrukte mit ausgetauschten NCoR/SMRT-Bereichen kloniert.

5.9 Ausblick

Rekrutierung von NCoR/SMRT-Komplexen

Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Bindung eines inversen Agonisten an PPAR β/δ zur verstärkten Rekrutierung von NCoR/SMRT-Komplexen führt. Sowohl die basale Repression als auch die Repression durch den inversen Agonisten wird mutmaßlich von diesen Co-Repressor Komplexen über Deacetylase-abhängige und Deacetylase-unabhängige Mechanismen vermittelt. Während die Deacetylase-Aktivität der Untereinheit HDAC3 hinreichend bekannt ist, finden sich in der Literatur zwar bereits seit längerer Zeit Hinweise auf Deacetylase-unabhängige Funktionen der NCoR/SMRT-Komplexe, der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Für zukünftige Experimente ist daher insbesondere die Aufklärung des Deacetylase-unabhängigen Repressionsmechanismus von NCoR/SMRT-Komplexen auch im Hinblick ihrer Rolle bei der Transrepression^[108] von großem Interesse.

Verminderte Rekrutierung von Mediator-Untereinheiten, TFIIB und der RNA-Polymerase II

In dieser Arbeit durchgeführte ChIP-qPCR Experimente legen nahe, dass die Rekrutierung der eher mit aktiver Transkription assoziierten Mediator-Untereinheiten MED1, MED26 und MED13L zum Transkriptionsstart von PPAR β/δ Zielgenen durch die Rekrutierung von NCoR/SMRT-Komplexen zu PPRES gestört wird. Ebenso wird die Rekrutierung des GTF TFIIB (nicht aber die Rekrutierung anderer GTFs wie TFIIA) in gegenüber aktivierenden Stimuli dominanter Weise unterbunden. Da der Mediator-Komplex die Rekrutierung von TFIIB fördert^[18], könnte die Ab-

wesenheit von Mediator-Untereinheiten (oder des gesamten Mediator-Komplexes) für die reduzierte Rekrutierung des GTF ursächlich sein. Sowohl der Mediator-Komplex als auch TFIIB sind für die Rekrutierung der RNA-Polymerase II erforderlich ^[18]. Haas *et al.* ^[96] beobachteten 2018, dass die *de novo* Rekrutierung der RNA-Polymerase II von TFIIB abhängig ist. Somit könnte die verminderte Rekrutierung der RNA-Polymerase II letztlich eine Folge der verminderten Rekrutierung aktivierender Mediator-Untereinheiten und von TFIIB sein.

Hypothese I: Inhibition von Acetyltransferase-Aktivität durch NCoR bzw. SMRT

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass NCoR bzw. SMRT (zumindest *in vitro*) die Aktivität von Acetyltransferasen inhibieren können ^[55, 315]. Acetyltransferase-Aktivität ist in einem nukleosomenfreien System *in vitro* für die Transkription erforderlich ^[298]. Die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIF tragen zur Initiation und Reinitiation der Transkription bei und sind Acetylierungssubstrate ^[50, 111]. Das in dieser Arbeit häufiger als aktivierender Stimulus verwendete TGF β wirkt über SMAD-Transkriptionsfaktoren, die letztlich die Lysin-Acetyltransferasen CBP und p300 rekrutieren, um die Transkription zu fördern ^[115]. Diese Acetyltransferasen sind ebenfalls Co-Aktivatoren von NF κ B ^[323] und AP-1 Transkriptionsfaktoren ^[130], die Ziele der durch Kernrezeptoren vermittelten Transrepression sind ^[125, 237], mit der auch NCoR/SMRT-Komplexe in Verbindung gebracht wurden ^[108]. Die Acetyltransferase-Komplexe TFIID (TAF1) ^[293] und SAGA (GCN5) ^[20] sind für die Transkription erforderlich. Somit erscheint es denkbar, dass NCoR bzw. SMRT durch die Inhibition von KATs Acetylierungen verhindert, die für den Ablauf der Transkription erforderlich sind. Sowohl Deacetylase-Aktivität als auch die Inhibition von Acetyltransferasen beeinflussen Acetylierungszustände negativ und wirken somit in die gleiche Richtung. Es erscheint daher sinnvoll, dass Co-Repressoren beide Mechanismen nutzen könnten, um Acetylierungen zu unterdrücken und eine effiziente Repression zu erreichen.

Die in dieser Arbeit unternommenen Ansätze zum Nachweis eines funktionellen Zusammenhangs zwischen NCoR/SMRT-Komplexen und der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ -Agonisten lieferten wegen technischer Schwierigkeiten nicht die erhofften Erkenntnisse. Um die aufgestellte Hypothese einer Inhibition von Acetyltransferase-Aktivität durch NCoR bzw. SMRT zu untersuchen, verfolgte Jessica Bigge im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (2019) einen auf *in vitro* Acetyltransferase-Assays basierenden Ansatz. Dabei sollten N-terminale Fragmente von NCoR bzw. SMRT auf eine Inhibition der KATs CBP und p300 untersucht werden. Im weiteren Verlauf sollte, durch einen Austausch von Domänen zwischen NCoR und SMRT (ähnlich wie für den Ansatz aus Kapitel 4.8.3 geplant), der für die Inhibition erforderliche Bereich eingegrenzt und Unterschiede in der Funktion von NCoR und SMRT untersucht werden. Bisher konnten die HAT-Domäne von CBP und das N-terminale SMRT-Fragment exprimiert werden. Leider zeigte die bakteriell exprimierte HAT-Domäne von CBP (unter Berücksichtigung einer Deletion des autoinhibitorischen Loops ^[278]) im Fluoreszenz-basierten Acetyltransferase-Assay keinerlei Aktivität. In der Zukunft sollte die Expression der HAT-Domänen

von CBP und p300 (GCN5 ist kommerziell erhältlich) und des N-terminalen NCoR-Fragments optimiert werden. Weiterhin sollen durch Immunpräzipitationen angereicherte endogene NCoR/SMRT-Komplexe verwendet werden.

Hypothese II: Regulation von Chromatin-Interaktionen durch NCoR bzw. SMRT

Chromosome Conformation Capture (3C) Experimente von T. Adhikary deuten darauf hin, dass der PPAR-Enhancer und der TGF β -responsive Enhancer von *ANGPTL4* in Anwesenheit des PPAR β/δ Agonisten GW501516 und von TGF β verstärkt Kontakte untereinander ausbilden. In ChIP-qPCR Experimenten wurde hingegen in Anwesenheit des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264 eine verminderte Rekrutierung der Cohesine SMC1 und SMC3 am PPAR-Enhancer von *ANGPTL4* festgestellt. Cohesin-Komplexe sind gemeinsam mit dem Mediator-Komplex an der Ausbildung von Chromatin-Interaktionen (*DNA Loops*) beteiligt^[129] und werden durch Acetylierungen stabilisiert^[150].

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine mögliche Regulation von Chromatin-Interaktionen durch NCoR und SMRT. So wurde von Horike *et al.* 2005^[103] postuliert, dass die DNA-Bindung von MeCP2 - einem Transkriptionsfaktor, der NCoR und SMRT rekrutiert - durch den Verlust der Interaktion distaler regulatorischer Elemente mit dem Promotor von Zielgenen eine Repression bewirkt. In Mäusen führt die genetische Deletion des Kernrezeptors Rev-erb α , der ebenfalls mit Ncor und Smrt interagiert, zu Veränderungen der Interaktionen zwischen distalen Elementen und dem Promotor von Zielgenen^[137].

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Beobachtungen die bereits von Kim *et al.* 2018^[137] aufgestellte Hypothese ableiten, wonach NCoR und SMRT die Ausbildung von Kontakten zwischen Enhancern und Promotoren stören. Angesichts der Stabilisierung von Cohesin-Komplexen durch Acetylierungen erscheint es denkbar, dass eine Regulation der Chromatin-Interaktion durch NCoR bzw. SMRT über die in Hypothese I postulierte Inhibition von Acetyltransferase-Aktivität vermittelt wird. Wie bereits in Kapitel 1.4.5 näher erläutert wurde, ist der generelle Transkriptionsfaktor TFIIB für die Ausbildung von Gen-Loops zwischen dem Transkriptionsstart und der Terminator-Region erforderlich^[71, 181, 263]. Diese ermöglichen das Übersetzen der RNA-Polymerase II, sodass diese nach der Reinitiation eine erneute Transkriptionsrunde durchlaufen kann. Der Mediator-Komplex kooperiert mit Cohesin bei der Bildung von Enhancer-Promotor-Loops^[129] (Kapitel 1.4.5). Somit könnte gegebenenfalls auch die Beeinträchtigung der Rekrutierung von aktivierenden Mediator-Untereinheiten und von TFIIB mit der Regulation von Chromatin-Interaktionen durch NCoR/SMRT-Komplexe in Verbindung stehen.

Eine von Prof. Ho-Ryun Chung entwickelte und in unserem Labor verfügbare, restriktionsunabhängige DNase-HiC Methode könnte von großem Wert für die weitere Untersuchung einer möglichen Regulation von Chromatin-Interaktionen durch NCoR bzw. SMRT sein. Prof. Chung ist seit 2018 Professor am Institut für Medizinische Bioinformatik und Biostatistik in Marburg und

unsere Arbeitsgruppe ist seither ihm unterstellt. Seine DNase-HiC Technik ermöglicht durch die starke Anreicherung DNase-hypersensitiver Regionen eine Reduktion des Hintergrundsignals (im Vergleich zu bislang bekannten HiC-Protokollen) und eine erhöhte Auflösung von unter einer Kilobase. Erst durch diese erhöhte Auflösung wird die Untersuchung der Chromatin-Interaktionen in unserem System möglich, da die PPREs der am stärksten regulierten PPAR β/δ Zielgene relativ nahe zum jeweiligen Transkriptionsstart liegen (Antrag eingereicht, Juli 2019). Der Einsatz von PPAR β/δ Liganden ermöglicht in unserem System ein schnelles Schalten zwischen der Rekrutierung von NCoR/SMRT Komplexen einerseits (durch inverse Agonisten) und ihrer Dissoziation andererseits (durch Agonisten). Daraus ergeben sich deutliche Vorteile gegenüber dem von Kim *et al.* 2018 ^[137] für die Untersuchung von Rev-erb α verwendeten System (*Knock-out* gegen Wildtyp), das anfällig für systematische Verschiebungen ist (hier etwa des zirkadianen Rhythmus, der durch Rev-erb α reguliert wird).

Alternative Deacetylase-unabhängige Repressionsmechanismen

Quevedo *et al.* untersuchten 2019 ^[236] das Interaktom des Mediator-Komplexes in der Maus. Dabei detektierten sie die Ncor/Smrt-Komplex Untereinheiten Ncor1, Ncor2, Tbl1x und Tbl1xr1 als Interaktoren des Mediator-Komplexes, wobei jedoch offen bleibt, mit welchen Untereinheiten des Mediators sie genau interagieren. Es wäre daher denkbar, dass NCoR/SMRT-Komplexe durch eine direkte Interaktion mit einer „inaktiven“ Mediator-Form die Rekrutierung von aktivierenden Untereinheiten zum Mediator blockieren. In weiteren Experimenten könnte die Klärung der Fragestellung, ob Untereinheiten des Kern-Mediators ^[119] (Kapitel 1.5.1) in Anwesenheit eines inversen PPAR β/δ Agonisten weiterhin zum Transkriptionsstart rekrutiert werden, wichtige neue Erkenntnisse liefern.

Wie bereits in Kapitel 1.3.3 erläutert, interagiert die Ubiquitin-spezifische Protease USP44 mit der TBL1-Untereinheit der NCoR/SMRT Komplexe. Lan *et al.* zeigten 2016 ^[151], dass die Deubiquitinierung von H2Bub1 durch USP44 zur repressiven Funktion des NCoR-Komplexes beiträgt. Lim *et al.* beobachteten 2016 ^[160], dass die Deubiquitinierungsaktivität von USP19 zur Stabilisierung von CORO2A als Untereinheit von NCoR/SMRT-Komplexen führt. Sie zeigten, dass CORO2A die transkriptionelle Repression durch den Kernrezeptor RAR fördert. Die TBL1-Untereinheit von NCoR/SMRT-Komplexen wurde mit E3-Ligase Aktivität und einer Funktion als *Exchange Factor* durch die Rekrutierung des Proteasom-Komplexes in Verbindung gebracht ^[226]. Gegebenenfalls könnte also der proteasomale Abbau von Co-Aktivatoren eine Rolle spielen.

Weiterhin interagieren NCoR und SMRT mit HDACs der Klasse IIa (Kapitel 1.3.3). Diese besitzen zwar offenbar keine intrinsische Deacetylase-Aktivität ^[79], jedoch wurde von Wang *et al.* 1999 ^[290] eine Deacetylase-unabhängige Repressionsdomäne im N-Terminus von HDAC4 beschrieben. Die N-terminalen Bereiche von HDAC4, -5 und -9 enthalten ein Interaktionsmotiv für den Co-Repressor CtBP ^[177]. Darüberhinaus wurde eine Interaktion von Klasse IIa HDACs mit HP1, welches mit Histon-Methyltransferasen assoziiert ist, beschrieben ^[177].

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] AAGAARD, M. M., SIERSBAEK, R. and MANDRUP, S. (2011). Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1812 (8): 824-835. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.12.018.
- [2] AASLAND, R., STEWART, A. F. and GIBSON, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci*. 21 (3): 87-88. doi: 10.1016/S0968-0004(96)30009-1.
- [3] ADAMCZEWSKI, J. P., *et al.* (1996). MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH. *EMBO J*. 15 (8): 1877-1884. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00538.x.
- [4] ADELMAN, K. and LIS, J. T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet*. 13 (10): 720-731. doi: 10.1038/nrg3293.
- [5] ADELMAN, K., *et al.* (2005). Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIIS. *Mol Cell*. 17 (1): 103-112. doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.028.
- [6] ADHIKARY, T. and MÜLLER, R. (2013). *In vivo* studies of PPAR-chromatin interactions: chromatin immunoprecipitations for single-locus and genomewide analyses. *Methods Mol Biol*. 952: 175-185. doi: 10.1007/978-1-62703-155-4_12.
- [7] ADHIKARY, T., *et al.* (2011). Genomewide analyses define different modes of transcriptional regulation by peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ). *PLoS One*. 6 (1): e16344. doi: 10.1371/journal.pone.0016344.
- [8] ADHIKARY, T., *et al.* (2013). Inverse PPAR β/δ agonists suppress oncogenic signaling to the *ANGPTL4* gene and inhibit cancer cell invasion. *Oncogene*. 32 (44): 5241-5252. doi: 10.1038/onc.2012.549.
- [9] ADHIKARY, T., *et al.* (2015). The transcriptional PPAR β/δ network in human macrophages defines a unique agonist-induced activation state. *Nucleic Acids Res*. 43(10):5033-51. doi: 10.1093/nar/gkv331.
- [10] AHN, S. H., KIM, M. and BURATOWSKI, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell*. 13 (1): 67-76. doi: 10.1016/S1097-2765(3)00492-1.
- [11] AKOULTICHEV, S., CHUIKOV, S. AND REINBERG, D. (2000). TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature*. 407 (6800): 102-106. doi: 10.1038/35024111.
- [12] ALBERTS, B., *et al.* (2008). Molecular Biology of the Cell. Fifth Edition. Chapter 6: How Cells Read the Genome: From DNA to Protein. *Garland Science*. New York: Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4105-5). 329-410.

- [13] ALLEN, B. L. and TAATJES, D. J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16 (3): 155-166. doi: 10.1038/nrm3951.
- [14] ANDRAU, J. C., et al. (2006). Genome-wide location of the coactivator mediator: Bindung without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol Cell.* 22 (2): 179-192. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.023.
- [15] ANSARI, A. and HAMPSEY, M. (2005). A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes Dev.* 19 (24): 2969-2978. doi: 10.1101/gad.1362305.
- [16] ARCHAMBAULT, J., et al. (1998). FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 273 (42): 27593-27601. doi: 10.1074/jbc.273.42.27593.
- [17] AUBLE, D. T. and HAHN, S. (1993). An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA. *Genes Dev.* 7 (5): 844-856. doi: 10.1101/gad.7.5.844.
- [18] BAEK, H. J., KANG, Y. K. and ROEDER R. G. (2006). Human Mediator enhances basal transcription by facilitating recruitment of transcription factor IIB during preinitiation complex assembly. *J Biol Chem.* 81 (22): 15172-15181. doi: 10.1074/jbc.M601983200.
- [19] BAIN, D. L., et al. (2017). Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol.* 69: 201-220. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.160308.
- [20] BAPTISTA, T., et al. (2017). SAGA is a general cofactor for RNA polymerase II transcription. *Mol Cell.* 68 (1): 130-143.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.016.
- [21] BARRIOS, Á. P., et al. (2014). Differential properties of transcriptional complexes formed by the CoREST family. *Mol Cell Biol.* 34 (14): 2760-2770. doi: 10.1128/MCB.00083-14.
- [22] BATISTA, F. A. H., et al. (2012). Structural insights into human peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR-delta) selective ligand binding. *PLoS One.* 7 (5): e33643. doi: 10.1371/journal.pone.0033643.
- [23] BENSAUDE, O., et al. (2011). Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription.* 2 (3): 103-108. doi: 10.4161/tms.2.3.16172.
- [24] BERGER, J. AND MOLLER, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 53: 409-435. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104018.
- [25] BERGER, J., et al. (1999). Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem.* 274 (10): 6718-6725. doi: 10.1074/jbc.274.10.6718.
- [26] BERNECKY, C., et al. (2011). Molecular architecture of the human Mediator-RNA polymerase II-TFIIF assembly. *PLoS Biol.* 9 (3): e1000603. doi: 10.1371/journal.pbio.1000603.
- [27] BHASKARA, S., et al. (2010). Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell.* 18 (5): 436-447. doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.022.
- [28] BIOLINE (o. J.). ImmoMix™ & ImmoMix Red™. *PI-50110 V4.*
- [29] BIO-RAD LABORATORIES, Inc. (o. J.). DC Protein Assay Instruction Manual. *LIT 448 Rev D.*

- [30] **BIO-RAD LABORATORIES, Inc. (o. J.).** iScript™ cDNA Synthesis Kit. *INST-653 Ver D (4106228)*.
- [31] **BLEICHENBACHER, M., TAN, S. and RICHMOND, T. J. (2003).** Novel interactions between the components of human and yeast TFIIA/TBP/DNA complexes. *J Mol Biol.* 332 (4): 783-793. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00887-8.
- [32] **BORGGREFE, T., et al. (2002).** A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J Biol Chem.* 277 (46): 44202-44207. doi: 10.1074/jbc.M207195200.
- [33] **BOURBON, H. M., et al. (2004).** A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell.* 14 (5): 553-557. doi: 10.1016/j.molcel.2004.05.011.
- [34] **BOURGUET, W., et al. (1995).** Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature.* 375 (6530): 377-382. doi: 10.1038/375377a0.
- [35] **BOYER, L. A., et al. (2002).** Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell.* 10 (4): 935-942. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00634-2.
- [36] **BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (o. J.).** Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen. In: *BVL-Abteilung Gentechnik*. Online unter: <https://zag.bvl.bund.de/ecoli/index.jsf?dswid=3923&dsrid=5>. [Stand: 05.05.19]
- [37] **BUNICK, D., et al. (1982).** Mechanism of RNA polymerase II-specific initiation in vitro: ATP requirement and uncapped runoff transcripts. *Cell.* 29 (3): 877-886. doi: 10.1016/0092-8674(82)90449-4.
- [38] **BUSHNELL, D. A., et al. (2004).** Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIIB cocrystal at 4.5 Ångströms. *Science.* 303 (5660): 983-988. doi: 10.1126/science.1090838.
- [39] **BURLEY, S. K. and ROEDER, R. G. (1996).** Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem.* 65: 769-799. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.004005.
- [40] **CALIPER LIFE SCIENCES (2011).** Bioware Ultra Cell Line MDA-MB-231-luc2. *BIO-SS-18*.
- [41] **CHALKLEY, G. E. and VERRIJZER, C. P. (1999).** DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J.* 18 (17): 4835-4845. doi: 10.1093/emboj/18.17.4835.
- [42] **CHAMBERS, R. S., et al. (1995).** The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J Biol Chem.* 270 (25): 14962-14969. doi: 10.1074/jbc.270.25.14962
- [43] **CHANDRA, V., et al. (2008).** Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature.* 456 (7220): 350-356. doi: 10.1038/nature07413.
- [44] **CHASMAN, D. I., et al. (1993).** Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proc Acad Sci USA.* 90 (17): 8174-8178. doi: 10.1073/pnas.90.17.8174.
- [45] **CHEN, J. D. and EVANS, R. M. (1995).** A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 377 (6548): 454-457. doi: 10.1038/377545a0.

- [46] CHEN, H.-T. and HAHN, S. (2003). Binding of TFIIB to RNA polymerase II: mapping the binding site for the TFIIB zinc ribbon domain within the preinitiation complex. *Mol Cell*. 12 (2): 437-447. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00306-X.
- [47] CHEN, H.-T. and HAHN, S. (2004). Mapping the location of TFIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. *Cell*. 119 (2): 169-180. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.028.
- [48] CHENG, B., et al. (2012). Functional association of Gdown1 with RNA polymerase II poised on human genes. *Mol Cell*. 45 (1): 38-50. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.022.
- [49] CHIEN, P. Y., et al. (1999). A fusion protein of the estrogen receptor (ER) and nuclear receptor corepressor (NCoR) strongly inhibits estrogen-dependent responses in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 13 (12): 2122-2136. doi: 10.1210/mend.13.12.0394.
- [50] CHOI, C. H., HIROMURA, M. and USHEVA, A. (2003). Transcription factor IIB acetylates itself to regulate transcription. *Nature*. 424 (6951): 965-969. doi: 10.1038/nature01899.
- [51] CODINA, A., et al. (2005). Structural insights into the interaction and activation of histone deacetylase 3 by nuclear receptor corepressors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (17): 6009-6014. doi: 10.1073/pnas.0500299102.
- [52] COLEMAN, R. A., et al. (1999). TFIIA regulates TBP and TFIID dimers. *Mol Cell*. 4 (3): 451-457. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80453-0.
- [53] CONAWAY, R. C. and CONAWAY, J. W. (1989). An RNA polymerase II transcription factor has an associated DNA-dependent ATPase (dATPase) activity strongly stimulated by the TATA region of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86 (19): 7356-7360. doi: 10.1073/pnas.86.19.7356.
- [54] CONNELLY, S. and MANLEY, J. L. (1988). A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes Dev*. 2 (4): 440-452. doi: 10.1101/gad.2.4.440.
- [55] COWGER, J. J. M. and TORCHIA, J. (2006). Direct association between the CREB-binding protein (CBP) and nuclear receptor corepressor (N-CoR). *Biochemistry*. 45 (44): 13150-13162. doi: 10.1021/bi060562g.
- [56] DAI, Y., et al. (2007). Sirtuin 1 is required for antagonist-induced transcriptional repression of androgen-responsive genes by the androgen receptor. *Mol Endocrinol*. 21 (8): 1807-1821. doi: 10.1210/me.2006-0467.
- [57] DALBY, B., et al. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. 33 (2): 95-103. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023.
- [58] DANIELS, D. L., et al. (2013). Mutual exclusivity of MED12/MED12L, MED13/13L, and CDK8/19 paralogs revealed within the CDK-Mediator kinase module. *J Proteomics Bioinform*. S2 (004). doi: 10.4172/jpb.S2-004.
- [59] DAVIDSON, L., MUNIZ, L. and WEST, S. (2014). 3' end formation of pre-mRNA and phosphorylation of Ser2 on the RNA polymerase II CTD are reciprocally coupled in human cells. *Genes Dev*.

- 28 (4): 342-356. doi: 10.1101/gad.231274.113.
- [60] **DE RUIJTER, A. J. M., et al. (2003).** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 370 (3): 737-749. doi: 10.1042/BJ20021321.
- [61] **DI-POÏ, N., et al. (2002).** Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell.* 10 (4): 721-733. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00646-9.
- [62] **DI-POÏ, N., et al. (2003).** The anti-apoptotic role of PPARbeta contributes to efficient skin wound healing. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85 (2-5): 257-265. doi: 10.1016/S0960-0760(03)00215-2.
- [63] **DONNER, A. J., et al. (2010).** CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat Struct Biol.* 17(2):194-201. doi: 10.1038/nsmb.1752.
- [64] **DRAPKIN, R., et al. (1994).** Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature.* 368 (6473): 769-772. doi: 10.1038/368769a0.
- [65] **DREER, M., et al. (2016).** Interaction of NCOR/SMRT repressor complexes with papillomavirus E8 ^E2C proteins inhibits viral replication. *PLoS Pathog.* 12 (4): e1005556. doi: 10.1371/journal.ppat.1005556.
- [66] **DUVAL, C., et al. (2002).** The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 8 (9): 422-430. doi: 10.1016/S1471-4914(02)02385-7.
- [67] **EBMEIER, C. C. and TAATJES, D. J. (2010).** Activator-Mediator binding regulates Mediator-cofactor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107 (25): 11283-11288. doi: 10.1073/pnas.0914215107.
- [68] **EGLOFF, S., et al. (2012).** Ser7 phosphorylation of the CTD recruits the RPAP2 Ser5 phosphatase to snRNA genes. *Mol Cell.* 45 (1): 111-122. doi: 10.1016/j.molcel.2011.11.006.
- [69] **EICK, D. and GEYER, M. (2013).** The RNA polymerase II carboxy-terminal domain (CTD) code. *Chem Rev.* 113 (11): 8456-8490. doi: 10.1021/cr400071f.
- [70] **EIFLER, T. T., et al. (2015).** Cyclin-dependent kinase 12 increases 3' end processing of growth factor-induced c-FOS transcripts. *Mol Cell Biol.* 35(2):468-78. doi: 10.1128/MCB.01157-14.
- [71] **EL KADERI, B., et al. (2009).** Gene looping is conferred by activator-dependent interaction of transcription initiation and termination machineries. *J Biol Chem.* 284 (37): 25015-25025. doi: 10.1074/jbc.M109.007948.
- [72] **ELMLUND, H., et al. (2006).** The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc Natl Sci USA.* 103 (43): 15788-15793. doi: 10.1073/pnas.067483103.
- [73] **EPENDORF AG (2013).** Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. *Application Note No. 279* März 2013.
- [74] **ESNAULT, C., et al. (2008).** Mediator-dependent recruitment of TFIIH modules in preinitiation complex. *Mol Cell.* 31 (3): 337-346. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.021.
- [75] **EUROPEAN SYNCHROTRON RADIATION FACILITY (2011).** TBL1, a tetrameric scaffold at the heart of the SMRT/NCOR transcriptional repression machinery. In: *Structural Biology*. Online unter: <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2011/sb/sb4>. [Stand: 08.05.19]

- [76] EYCHENNE, T., *et al.* (2016). Functional interplay between Mediator and TFIIB in preinitiation complex assembly in relation to promoter architecture. *Genes Dev.* 30 (18): 2119-2132. doi: 10.1101/gad.285775.116.
- [77] FELGNER, P. L., *et al.* (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84 (21): 7413-7417. doi: 10.1073/pnas.84.21.7413.
- [78] FIERZ, B., *et al.* (2011). Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nat Chem Biol.* 7 (2): 113-119. doi: 10.1038/nchembio.501.
- [79] FISCHLE, W., *et al.* (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell.* 9 (1): 45-57. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00429-4.
- [80] FISHER, R. P., *et al.* (1995). Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell.* 83 (1): 47-57. doi: 10.1016/0092-8674(95)90233-3.
- [81] FLORES, O., *et al.* (1991). The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc Natl Acad USA.* 88 (22): 9999-10003. doi: 10.1073/pnas.88.22.9999.
- [82] FORGET, D., *et al.* (2004). Photo-cross-linking of a purified preinitiation complex reveals central roles for the RNA polymerase II mobile clamp and TFIIE in initiation mechanisms. *Mol Cell Biol.* 24 (3): 1122-1131. doi: 10.1128/MCB.24.3.1122-1131.2004.
- [83] FU, J., *et al.* (2007). Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation. *Mol Cell Biol.* 27 (13): 4641-4651. doi: 10.1128/MCB.00857-06.
- [84] FUJINAGA, K., *et al.* (2004). Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from transactivation response element. *Mol Cell Biol.* 24 (2): 787-795. doi: 10.1128/MCB.24.2.787-795.2004.
- [85] GEIGER, J. H. *et al.* (1996). Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science.* 272 (5263): 830-836. doi: 10.1126/science.272.5263.830.
- [86] GHAZY, M. A., *et al.* (2004). Amino acid substitutions in yeast TFIIF confer upstream shifts in transcription initiation and altered interaction with RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 24 (24): 10975-10985. doi: 10.1128/MCB.24.24.10975-10985.2004.
- [87] GAMPE, R. T., *et al.* (2000). Asymmetry in the PPARgamma/ RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell.* 5 (3): 545-555. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80448-7.
- [88] GIRROIR, E. E., *et al.* (2008). Quantitative expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) protein in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 371 (3): 456-461. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.086.
- [89] GLOVER-CUTTER, K., *et al.* (2009). TFIIF-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 29 (20): 5455-5464. doi: 10.1128/MCB.00637-09.

- [90] GOODSON, M. L., *et al.* (2011). Alternative mRNA splicing of corepressors generates variants that play opposing roles in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 286 (52): 44988-99. doi: 10.1074/jbc.M111.291625.
- [91] GROMAK, N., WEST, S. and PROUDFOOT, N. J. (2006). Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 26 (10): 3986-3996. doi: 10.1128/MCB.26.10.3986-3996.2006.
- [92] GU, B., EICK, D. and BENSAUDE, O. (2013). CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 41 (3):1591-603. doi: 10.1093/nar/gks1327.
- [93] GUENTHER, M. G., BARAK, O. and LAZAR, M. A. (2001). SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol.* 21 (18): 6091-6101. doi: 10.1128/MCB.21.18.6091-6101.2001.
- [94] GUENTHER, M. G., *et al.* (2000). A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev.* 14 (9): 1048-1057. doi: 10.1101/gad14.9.1048.
- [95] GUZDER, S. N., *et al.* (1994). RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Nature.* 369 (6481): 578-581. doi: 10.1083/369578a0.
- [96] HAAS, D. A., *et al.* (2018). Viral trageting of TFIIB impairs de novo polymerase II recruitment and affects antiviral immunity. *PLoS Pathol.* 14 (4): e1006980. doi: 10.1371/journal.ppat.1006980.
- [97] HAHN, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol.* 11 (5): 394-403. doi: 10.1038/nsmb763.
- [98] HAMPSEY, M., *et al.* (2011). Control of eukaryotic gene expression: gene loops and transcriptional memory. *Adv Enzyme Regul.* 51 (1): 118-125. doi: 10.1016/j.advenzreg.2010.10.001.
- [99] HAYNES, C., *et al.* (2006). Intrinsic disorder is a common feature of hub proteins from four eukaryotic interactomes. *PLoS Comput Biol.* 2 (8): e100. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020100.
- [100] HE, X., *et al.* (2003). Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes Dev.* 17 (8): 1030-1042. doi: 10.1101/gad.1075203.
- [101] HE, Y., *et al.* (2013). Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature.* 495 (7442): 481-486. doi: 10.1038/nature11991.
- [102] HINTERMAIR, C., *et al.* (2012). Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase 3 and required for transcriptional elongation. *EMBO J.* 31(12):2784-97. doi: 10.1038/emboj.2012.123.
- [103] HORIKE, S., *et al.* (2005). Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet.* 37 (1): 31-40. doi: 10.1038/ng1491.
- [104] HÖRLEIN, A. J., *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature.* 377 (6548): 379-404. doi: 10.1038/377397a0.

- [105] Hsu, M. H., *et al.* (1998). A carboxy-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J Biol Chem.* 273 (43): 27988-27997. doi: 10.1074/jbc.273.43.27988.
- [106] Hsu, P. D., LANDER, E. S. and ZHANG, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 157 (6): 1262-1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [107] HU, X. and LAZAR, M. A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature.* 402 (6757): 93-96. doi: 10.1038/47069
- [108] HUA, G., GANTI, K. P. and CHAMBON, P. (2016). Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113 (5): E635-643. doi: 10.1073/pnas.1522826113.
- [109] HUANG, E. Y., *et al.* (2000). Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev.* 14 (1): 45-54. doi: 10.1101/gad.14.1.45.
- [110] IJPENBERG, A., JEANNIN, E., WAHLI, W. and DESVERGNE, B. (1997). Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/ retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. *J Biol Chem.* 272 (32): 20108-20117. doi: 10.1074/jbc.272.32.20108.
- [111] IMHOF, A., *et al.* (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol.* 7 (9): 689-692. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00296-X.
- [112] INOUE, T., *et al.* (2014). Cross-enhancement of *ANGPTL4* transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. *Genome Biol.* 15 (4): R63. doi: 10.1186/gb-2014-15-4-r63.
- [113] INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, Inc. (o. J.). Genome editing with CRISPR-Cas9. In: *Integrated DNA Technologies*. Online unter: <https://eu.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing/alt-r-crispr-cas9-system>. [Stand: 07.04.19]
- [114] JANG, M. K., *et al.* (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell.* 19 (4): 523-534. doi: 10.1016/j.molcel.2005.06.027.
- [115] JANKNECHT, R., WELLS, N. J. and HUNTER, T. (1998). TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev.* 12 (14): 2114-2119. doi: 10.1101/gad.12.14.2114.
- [116] JEONG, S. J., *et al.* (2005). Role of RNA polymerase II carboxy terminal domain phosphorylation in DNA damage response. *J Microbiol.* 43 (6): 516-522.
- [117] JERONIMO, C., BATAILLE, A. R. and ROBERT, F. (2013). The writers, readers, and functions of the RNA polymerase II C-terminal domain code. *Chem Rev.* 113 (11): 8491-8522. doi: 10.1021/cr4001397.
- [118] JERONIMO, C. and ROBERT, F. (2014). Kin28 regulates the transient association of Mediator with core promoters. *Nat Struct Biol.* 21 (5): 449-455. doi: 10.1038/nsmb.2810.
- [119] JERONIMO, C. and ROBERT, F. (2017). The Mediator complex: At the nexus of RNA polymerase II

- transcription. *Trends Cell Biol.* 27 (10): 765-783. doi: 10.1016/j.tcb.2017.07.001.
- [120] JERONIMO, C., *et al.* (2016). Tail and kinase modules differently regulate Core Mediator recruitment and function in vivo. *Mol Cell.* 64(3):455-466. doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.002.
- [121] JIANG, Y. and GRALLA, J. D. (1993). Uncoupling of initiation and reinitiation rates during HeLa RNA polymerase transcription *in vitro*. *Mol Cell Biol.* 13 (8): 4572-4577. doi: 10.1128/MCB.13.8.45.72.
- [122] JISHAGE, M., *et al.* (2012). Transcriptional regulation by Pol II(G) involving mediator and competitive interactions of Gdown1 and TFIIF with Pol II. *Mol Cell.* 45 (1): 51-63. doi: 10.1016/j.molcel.2011.12.014.
- [123] JOHNSON, K. M. and CAREY, M. (2003). Assembly of a Mediator/TFIID/TFIIA complex bypasses the need for an activator. *Curr Biol.* 13 (9): 772-777. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00283-5.
- [124] JOHNSON, K. M., *et al.* (2002). TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA. *Genes Dev.* 16 (14): 1852-1863. doi: 10.1101/gad.995702.
- [125] JONAT, C., *et al.* (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell.* 62 (6): 1189-1204. doi: 10-1016/0092-8674(90)90395-U.
- [126] JOSLING, G. A., *et al.* (2012). The role of bromodomain proteins in regulating gene expression. *Genes (Basel).* 3 (2): 320-43. doi: 10.3390/genes3020320.
- [127] JUGE-AUBRY, C. E., *et al.* (1999). Regulation of transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem.* 274 (15): 10505-10510. doi: 10.1074/jbc.274.15.10505.
- [128] KADDATZ, K., *et al.* (2010). Transcriptional profiling identifies functional interactions of TGF β and PPAR β/δ signaling: synergistic induction of *ANGPTL4* transcription. *J Biol Chem.* 285 (38): 29469-29479. doi: 10.1074/jbc.M110.142018.
- [129] KAGEY, M. H., *et al.* (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature.* 467 (7314): 430-435. doi: 10.1038/nature09380.
- [130] KAMEI, Y., *et al.* (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell.* 85 (3): 403-414. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81118-6.
- [131] KANAZAWA, S., *et al.* (2003). c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene.* 22 (36): 5707-5711. doi: 10.1038/sj.onc.1206800.
- [132] KAO, C. C. *et al.* (1990). Cloning of a transcriptionally active human TATA binding factor. *Science.* 248 (4963): 1646-1650. doi: 10.1126/science.2194289.
- [133] KAO, H. Y., *et al.* (2000). Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.* 14 (1): 55-66. doi: 10.1101/gad.14.1.55.
- [134] KIM, J. L., NIKOLOV, D. B. and BURLEY, S. K. (1993). Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature.* 365 (6446): 520-527. doi: 10.1038/365520a0.
- [135] KIM, T.-K., EBRIGHT, R. H. and REINBERG, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter

- melting by transcription factor IIH. *Science*. 288 (5470): 1418-1422.
doi: 10.1126/science.288.5470.1418.
- [136] KIM, Y., *et al.* (1993). Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature*. 365 (6446): 512-520. doi: 10.1038/365512a0.
- [137] KIM, Y. H., *et al.* (2018). Rev-erba dynamically modulates chromatin looping to control circadian gene transcription. *Science*. 359 (6381): 1274-1277.
doi: 10.1126/science.aao6891.
- [138] KIM, Y.-J., *et al.* (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*. 77 (4): 599-608.
doi: 10.1016/0092-8674(94)90221-6.
- [139] KINSELLA, T. M. and NOLAN, G. P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther*. 7 (12): 1405-1413. doi: 10.1089/hum.1996.7.12-1405.
- [140] KLIEWER, S. A., *et al.* (1992). Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 358 (6389): 771-774. doi: 10.1038/358771a0.
- [141] KNUESEL, M. T., *et al.* (2009). The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes Dev*. 23 (4): 439-451. doi: 10.1101/gad.1767009.
- [142] KOBOR, M. S., *et al.* (2000). A motif shared by TFIIF and TFIIB mediates their interaction with the RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphatase Fcp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 20 (20): 7438-7449. doi: 10.1128/MCB.20.20.7438-7449.2000.
- [143] KOERNER, M. V., *et al.* (2018). Toxicity of overexpresses MeCP2 is independent of HDAC3 activity. *Genes Dev*. 32 (23-24): 1514-1524. doi: 10.1101/gad.320325.118.
- [144] KOKUBO, T., *et al.* (1998). The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*. 18 (2): 1003-1012. doi: 10.1128/mcb.18.2.1003.
- [145] KOLESKE, A. J. and YOUNG, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*. 368 (6470): 466-469. doi: 10.1038/368466a0.
- [146] KOLESKE, A. J. and YOUNG, R. A. (1995). The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem Sci*. 20 (3): 113-116.
doi: 10.1016/S0968-0004(00)88977-X.
- [147] KOSTREWA, D., *et al.* (2009). RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature*. 462 (7271): 323-330. doi: 10.1038/nature08548.
- [148] KROGSDAM, A. M., *et al.* (2002). Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation. *Biochem J*. 363 (Pt 1): 157-165. doi: 10.1042/0264-6021:3630157.
- [149] KUGEL, J. F. and GOODRICH, J. A. (2000). A kinetic model for the early steps of RNA synthesis by human RNA polymerase II. *J Biol Chem*. 275 (51): 40483-40491. doi: 10.1074/jbc.M006401200.
- [150] KULEMZINA, I., *et al.* (2016). A reversible association between Smc coiled coils is regulated by

- lysine acetylation and is required for cohesin association with the DNA. *Mol Cell*. 63(6):1044-54. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.008.
- [151] LAN, X., *et al.* (2016). USP44 is an integral component of N-CoR that contributes to gene repression by deubiquitinating histone H2B. *Cell Rep*. 17 (9): 2382-2393. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.076.
- [152] LEE, C. H., *et al.* (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103 (9): 3444-3449. doi: 10.1073/pnas.0511253103.
- [153] LEE, D. H., *et al.* (2005). Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1. *Mol Cell Biol*. 25 (21): 9674-9686. doi: 10.1128/MCB.25.21.9674-9686.2005.
- [154] LEFEBVRE, B., MOUCHON, A., FORMSTECHE, P. and LEFEBVRE, P. (1998). H11-H12 Loop Retinoic Acid Receptor Mutants Exhibit Distinct trans-Activating and trans-Repressing Activities in the Presence of Natural or Synthetic Retinoids. *Biochemistry*. 37 (26): 9240-9249. doi: 10.1021/bi9804840.
- [155] LEGRAND, N. (2016). Mechanismus der transkriptionellen Repression durch inverse PPAR β/δ Agonisten. *Masterarbeit*. Philipps-Universität Marburg.
- [156] LI, H., *et al.* (1997). Characterization of receptor interaction and transcriptional repression by the corepressor SMRT. *Mol Endocrinol*. 11 (13): 2025-2037. doi: 10.1210/mend.11.13.0028.
- [157] LI, J., *et al.* (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J*. 19 (16): 4342-4350. doi: 10.1093/emboj/19.16.4342.
- [158] LIEBER, S., *et al.* (2012). (Z)-2-2(2-bromophenyl)-3-[[4-(1-methyl-piperazine)amino]phenyl]acrylonitrile (DG172): an orally bioavailable PPAR β/δ -selective ligand with inverse agonistic properties. *J Med Chem*. 55 (6): 2858-2868. doi: 10.1021/jm2017122.
- [159] LIM, H., *et al.* (1999). Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev*. 13 (12): 1561-1574. doi: 10.1101/gad.13.12.1561.
- [160] LIM, K. H., *et al.* (2016). Ubiquitin specific protease 19 involved in transcriptional repression of retinoic acid receptor by stabilizing CORO2A. *Oncotarget*. 7 (23): 34759-72. doi: 10.18632/oncotarget.8976.
- [161] LIN, Y. C. and GRALLA, J. D. (2005). Stimulation of the XPB ATP-dependent helicase by the beta subunit of TFIIIE. *Nucleic Acids Res*. 33 (9): 3072-3081. doi: 10.1093/nar/gki623.
- [162] LIN, C., *et al.* (2010). AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Mol Cell*. 37 (3): 429-437. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.026.
- [163] LIU, X., *et al.* (2011). Initiation complex structure and promoter proofreading. *Science*. 333 (6042): 633-637. doi: 10.1126/science.1206629.
- [164] LORI, C., *et al.* (2012). Structural basis of the transactivation deficiency of the human PPAR γ F360L mutant associated with familial partial lipodystrophy. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 70: 1965-1976. doi: 10.1107/S1399004714009638.

- [165] LU, H., *et al.* (1991). The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88 (22): 10004-10008. doi: 10.1073/pnas.88.22.10004.
- [166] LU, H., *et al.* (1992). Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature*. 358 (6388): 641-645. doi: 10.1038/358641a0.
- [167] LU, X., *et al.* (2016). Multiple P-TEFbs cooperatively regulate the release of promoter-proximally paused RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res*. 44 (14): 6853-6867. doi: 10.1093/nar/gkw571.
- [168] LYST, X., *et al.* (2013). Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor. *Nat Neurosci*. 16 (7): 898-902. doi: 10.1038/nn.3434.
- [169] MACHEREY-NAGEL, GmbH & Co. KG (2015). RNA isolation. 06/2015, Rev 17.
- [170] MACHEREY-NAGEL, GmbH & Co. KG (2017). Plasmid DNA purification. 03/2017, Rev. 14.
- [171] MALI, P., *et al.* (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339 (6121): 823-826. doi: 10.1126/science.1232033.
- [172] MALIK, S. and ROEDER, R. G. (2010). The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet*. 11 (11): 761-772. doi: 10.1038/nrg2901.
- [173] MANDEL, C. R., *et al.* (2006). Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease. *Nature*. 444 (7121): 953-956. doi: 10.1038/nature05363.
- [174] MANDARD, S., *et al.* (2006). The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem*. 281 (2): 934-944. doi: 10.1074/jbc.M506519200.
- [175] MARMORSTEIN, R. and ZHOU, M. M. (2014). Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 6 (7): a018762. doi: 10.1101/cshperspect.a018762.
- [176] MARSHALL, N. F. and PRICE, D. H. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem*. 270 (21): 12335-12338. doi: 10.1074/jbc.270.21.12335.
- [177] MARTIN, M., KETTMANN, R. and DEQUIEDT, F. (2007). Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene*. 26 (37): 5450-5467. doi: 10.1038/sj.onc.1210613.
- [178] MAYER, A., *et al.* (2012). CTD tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science*. 336 (6089): 1723-1725. doi: 10.1126/science.1219651.
- [179] MAXON, M. E., GOODRICH, J. A. and TJIAN, R. (1994). Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model of promoter clearance. *Genes Dev*. 8 (5): 515-524. doi: 10.1101/gad.8.5.515.
- [180] MCCracken, S., *et al.* (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*. 385 (6614): 357-361. doi: 10.1038/385357a0.
- [181] MEDLER, S., *et al.* (2011). Evidence for a complex of transcription factor IIB with poly(A) polymerase and cleavage factor 1 subunits required for gene looping. *J Biol Chem*.

- 286 (39): 33709-33718. doi: 0.1074/jbc.M110.193870.
- [182] MICHALIK, L. and WAHLI, W. (2006). Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest.* 116 (3): 598-606. doi: 10.1172/JCI27958.
- [183] MICHALIK, L., *et al.* (2006). International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 58 (4): 726-741. doi: 10.1124/pr.58.4.5
- [184] MICHALIK, L., *et al.* (2007). Combined simulation and mutagenesis analyses reveal the involvement of key residues for peroxisome proliferator-activated receptor alpha helix 12 dynamic behavior. *J Biol Chem.* 282 (13): 9666-9677.
- [185] MITTLER, G., *et al.* (2001). Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription. *EMBO Rep.* 2 (9): 808-813. doi: 10.1093/embo-reports/kve186.
- [186] MONTAGNER, A. and WAHLI, W. (2013). Contributions of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ to skin health and disease. *Biomol Concepts.* 4 (1): 53-64. doi: 10.1515/bmc-2012-0035.
- [187] MONTAGNER, A., *et al.* (2011). New insights into the role of PPARs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 85 (5): 235-243. doi: 10.1016/j.plefa.2011.04.016.
- [188] MOSLEY, A. L., *et al.* (2009). Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Mol Cell.* 34 (2): 168-178. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.025.
- [189] MOTTIS, A., MOUCHIROUD, L. and AUWERX, J. (2013). Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes Dev.* 27(8):819-35. doi: 10.1101/gad.214023.113.
- [190] MUKUNDAN, B. and ANSARI, A. (2013). Srb5/Med18-mediated termination of transcription is dependent on gene looping. *J Biol Chem.* 288 (16): 11384-11394. doi: 10.1074/jbc.M112.446773.
- [191] MÜLLER, R. (2017). PPAR β/δ in human cancer. *Biochimie.* 136:90-99. doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.019.
- [192] MÜLLER, R., RIECK, M. and MÜLLER-BRÜSELBACH, S. (2008). Regulation of Cell Proliferation and Differentiation by PPARbeta/delta. *PPAR Res 2008.* 2008: 614852. doi: 10.1155/2008/614852.
- [193] MÜLLER, R., *et al.* (2008). A Role for PPARbeta/delta in Tumor Stroma and Tumorigenesis. *PPAR Res 2008.* 2008: 534294. doi: 10.1155/2008/534294.
- [194] MÜLLER-BRÜSELBACH, S., *et al.* (2007). Deregulation of tumor angiogenesis and blockade of tumor growth in PPARbeta-deficient mice. *EMBO J.* 26 (15): 3686-3698. doi: 10.1038/sj.emboj.7601803.
- [195] MUSCAT, G. E., BURKE, L. J. and DOWNES, M. (1998). The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13 Δ 1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAF $_{II}$ 32 and TAF $_{II}$ 70. *Nucleic Acids Res.* 26 (12): 2899-2907. doi: 10.1093/nar/26.12.2899.
- [196] MYERS, L. C., *et al.* (2002). The yeast capping enzyme represses RNA polymerase II transcription. *Mol Cell.* 10 (4): 883-894. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00644-5.
- [197] NÄÄR, A. M., *et al.* (2002). Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes Dev.* 16 (11): 1339-1344. doi: 10.1101/gad.987602.

- [198] NADRA, K., *et al.* (2006). Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . *Mol Cell Biol.* 26 (8): 3266-3281. doi: 10.1128/MCB.26.8.3266-3281.2006.
- [199] NAG, A., NARSINH, K. and MARTINSON, H. G. (2007). The poly(A)-dependent transcriptional pause is mediated by CPSF acting on the body of the polymerase. *Nat Struct Mol Biol.* 14 (7): 662-669. doi: 10.1038/nsmb1253
- [200] NAGY, L., *et al.* (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 89 (3): 373-380. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80218-4.
- [201] NARUHN, S., *et al.* (2010). 15-hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist. *Mol Pharmacol.* 77 (2): 171-184. doi: 10.1124/mol.109.060541.
- [202] NARUHN, S., *et al.* (2011). High-affinity peroxisome proliferator-activated receptor β/δ -specific ligands with pure antagonistic or inverse agonistic properties. *Mol Pharmacol.* 80 (5): 828-838. doi: 10.1124/mol.111.074039.
- [203] NEE, I. (2019). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung neuartiger Transkriptionsmodulatoren. *Dissertation*. Philipps-Universität Marburg.
- [204] NEELS, J. G. and GRIMALDI, P. A. (2014). Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor β . *Physiol Rev.* 94 (3): 795-858. doi: 10.1152/physrev.00027.2013.
- [205] NEW ENGLAND BIOLABS, GmbH (o. J.). Q5™ High-Fidelity DNA Polymerase.
- [206] NG, H. H., *et al.* (2002). Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J Biol Chem.* 277 (38): 34655-34657. doi: 10.1074/jbc.C200433200.
- [207] NIKOLOV, D. B. *et al.* (1996). Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc Natl Acad USA.* 93 (10): 4862-4867. doi: 10.1073/pnas.93.10.4862.
- [208] NOLAN, G. P. (o. J.). Phoenix helper-free retrovirus producer lines. In: *Nolan Lab*. Online unter: https://web.stanford.edu/group/nolan/_OldWebsite/retroviral_systems/phx.html. [Stand: 07.04.19]
- [209] NOLAN, G. P. (o. J.). Phoenix Retroviral Producer Line Protocol. In: *Nolan Lab*. Online unter: https://web.stanford.edu/group/nolan/_OldWebsite/protocols/pro_helper_dep.html. [Stand: 07.04.19]
- [210] NOLTE, R. T., *et al.* (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature.* 395 (6698): 137-143. doi: 10.1038/25931.
- [211] NUCLEAR RECEPTORS NOMENCLATURE COMMITTEE (1999). A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell.* 97 (2): 161-163. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80726-6.
- [212] OBEROI, J., *et al.* (2011). Structural basis for the assembly of the SMRT/NCOR core transcriptional repression machinery. *Nat Struct Mol Biol.* 18 (2): 177-184. doi: 10.1038/nsmb.1983.
- [213] OHKUMA, Y. and ROEDER, R. G. (1994). Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIIE during active initiation complex formation. *Nature.* 368 (6467): 160-163. doi: 10.1038/368160a0.

- [214] OHKUMA, Y., *et al.* (1995). Analysis of the role of TFIIIE in basal transcription and TFIIH-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIIE- α . *Mol Cell Biol.* 15 (9): 4856-4866. doi: 10.1128/MCB.15.9.4856.
- [215] OLIVER, W. R., *et al.* (2001). A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98 (9): 5306-5311. doi: 10.1073/pnas.091021198.
- [216] ORPHANIDES, G., LAGRANGE, T. and REINBERG, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 20 (21): 2657-2683. doi: 10.1101/gad.10.21.2657.
- [217] O'SULLIVAN, J. M., *et al.* (2004). Gene loops juxtapose promoters and terminators in yeast. *Nat Genet.* 36: 1014-1018. doi: 10.1038/ng1411.
- [218] PADUA, D., *et al.* (2008). TGF β primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell.* 133 (1): 66-77. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.046.
- [219] PAL, M., PONTICELLI, A. S. and LUSE, D. S. (2005). The role of the transcription bubble and TFIIB in promoter clearance by RNA polymerase II. *Mol Cell.* 19 (1): 101-110. doi: 10.1016/j.molcel.2005.05.024.
- [220] PAOLETTI, A. C., *et al.* (2006). Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103 (50): 18928-18933. doi: 10.1073/pnas.0606379103.
- [221] PARK, J. H., SUN, X. J. and ROEDER, R. G. (2010). The SANT domain of p400 ATPase represses acetyltransferase activity and coactivator function of TIP60 in basal p21 gene expression. doi: 30(11):2750-61. doi: 10.1128/MCB.00804-09.
- [222] PARK, S. W., *et al.* (2005). Thyroid hormone-induced juxtaposition of regulatory elements/factors and chromatin remodeling of Crabp1 dependent on MED1/TRAP220. *Mol Cell.* 19 (5): 643-653. doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.008.
- [223] PEI, Y., SCHWER, B. and SHUMAN, S. (2003). Interactions between fission yeast Cdk9, its cyclin partner Pch1, and mRNA capping enzyme Pct1 suggest an elongation checkpoint for mRNA quality control. *J Biol Chem.* 278 (9): 7180-7188. doi: 10.1074/jbc.M211713200.
- [224] PÉREZ CAÑADILLAS, J. M. and VARANI, G. (2003). Recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human CstF-64 protein. *EMBO J.* 22 (11): 2821-2830. doi: 10.1093/emboj/cdg259.
- [225] PERISSI, V., *et al.* (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev.* 13 (24): 3198-3208. doi: 10.1101/gad.13.24.3198.
- [226] PERISSI, V., *et al.* (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell.* 116 (4): 511-526. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00133-3.
- [227] PETERS, J. M., GONZALEZ, F. J. and MÜLLER R. (2012). Establishing the Role of PPAR β/δ in Carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 26(11):595-607. doi: 10.1016/j.tem.2015.09.004.
- [228] PETERS, J. M., SHAH, Y. M. and GONZALEZ, F. J. (2012). The role of peroxisome proliferator-acti-

- ted receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 12 (3): 181-195. doi: 10.1038/nrc3214.
- [229] PETERSON, M. G. *et al.* (1990). Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science*. 248 (4963): 1625-1630. doi: 10.1126/science.2363050.
- [230] PETRENKO, N., *et al.* (2016). Mediator undergoes a compositional change during transcriptional activation. *Mol Cell*. 64 (3): 443-454. doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.015.
- [231] PICARD, F., *et al.* (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 429 (6993): 771-776. doi: 10.1038/nature02583.
- [232] PING, Y.-H. and RANA, T. M. (2001). DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *J Biol Chem*. 276 (16): 12951-12958. doi: 10.1074/jbc.M006130200.
- [233] PLASCHKA, C., *et al.* (2015). Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex. *Nature*. 518 (7539): 376-380. doi: 10.1038/nature14229.
- [234] PRICE, D. H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. 20 (8): 2629-2634. doi: 10.1128/MCB.20.8.2629-2634.2000.
- [235] PUGH, B. F. and TJIAN, R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev*. 5 (11): 1935-1945. doi: 10.1101/gad.5.11.1935.
- [236] QUEVEDO, M., *et al.* (2019). Mediator complex interaction partners organize the transcriptional network that defines neural stem cells. *Nat Commun*. 10 (1): 2669. doi: 10.1038/s41467-019-10502-8.
- [237] RAY, A. and PREFONTAINE, K. E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91 (2): 752-756. doi: 10.1073/pnas.91.2.752.
- [238] REYES-REYES, M. and HAMPSEY, M. (2007). Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation. *Mol Cell Biol*. 27 (3): 926-936. doi: 10.1128/MCB.01361-06.
- [239] ROBERT, F., *et al.* (1998). Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIIF. *Mol Cell*. 2 (3): 341-351. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80278-6.
- [240] ROBINSON, P. J., *et al.* (2015). Molecular architecture of the yeast Mediator complex. *Elife*. 4. pii: e08719. doi: 10.7554/eLife.08719.
- [241] RODRIGUEZ, C. R., *et al.* (2000). Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. 20 (1): 104-112. doi: 10.1128.MCB.20.1.104-112.2000.
- [242] ROHS, R., *et al.* (2009). The role of DNA shape in protein-DNA recognition. *Nature*. 461 (7268): 1248-1253. doi: 10.1038/nature08473.
- [243] ROMANOWSKA, M., *et al.* (2010). Activation of PPARbeta/delta causes a psoriasis-like skin disease *in vivo*. *PLoS One*. 5 (3): e9701. doi: 10.1371/journal.pone.0009701.

- [244] SAINSBURY, S., BERNECKY, C. and CRAMER, P. (2015). Structural basis of transcription by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16 (3): 129-143. doi: 10.1038/nrm3952.
- [245] SAINSBURY, S., NIESSER, J. and CRAMER, P. (2013). Structure and function of the initially transcribing RNA polymerase II-TFIIB complex. *Nature.* 493 (7432): 437-440. doi: 10.1038/nature11715.
- [246] SAUNDERS, A., CORE, L. J. and LIS, J. T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 (8): 557-567. doi: 10.1038/nrm1981.
- [247] SAWADOGO, M. and ROEDER, R. G. (1984). Energy requirement for specific transcription initiation by the human RNA polymerase II system. *J Biol Chem.* 259 (8). 5321-5326.
- [248] SCHAEFFER, L., et al. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science.* 260 (5104): 58-63. doi: 10.1126/science.8465201.
- [249] SCHAEFFER, L., et al. (1994). The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J.* 13 (10): 2388-2392. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06522.x.
- [250] SCHREIECK, A., EASTER, A. D., et al. (2014). RNA polymerase II termination involves C-terminal-domain tyrosine desphosphorylation by CPF subunit Glc7. *Nat Struct Mol Biol.* 21 (2): 175-179. doi: 10.1038/nsmb.2753.
- [251] SCHROEDER, S. C., et al. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev.* 14 (19): 2435-2440. doi: 10.1101/gad.836300.
- [252] SCHUMANN, T., et al. (2015). Deregulation of PPAR β/δ target genes in tumor-associated macrophages by fatty acid ligands in the ovarian cancer microenvironment. *Oncotarget.* 6 (15): 13416-13433. doi: 10.18632/oncotarget.3826.
- [253] SCHWEINGRUBER, C., et al. (2013). Nonsense-mediated mRNA decay – mechanisms of substrate recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1829 (6-7): 612-623. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.02.005.
- [254] SERIZAWA, H., CONAWAY, J. W. and CONAWAY, R. C. (1994). An oligomeric form of the large subunit of transcription factor (TF) IIE activates phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain by TFIIH. *J Biol Chem.* 269 (32): 20750-20756.
- [255] SERRANO, M., et al. (1997). Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell.* 88 (5): 593-602. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
- [256] SHANDILYA, J. and ROBERTS, S. G. E. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta.* 1819 (5): 391-400. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.01.010.
- [257] SHAO, H., et al. (2005). Core promoter binding by histone-like TAF complexes. *Mol Cell Biol.* 25 (1): 206-219. doi: 10.1128/MCB.25.1.206-219.2005.
- [258] SHEARER, B. G., et al. (2007). Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist. *Mol Endocrinol.* 22 (2): 523-529. doi: 10.1210/me.2007-0190.

- [259] **SHI, Y., HON, M. and EVANS, R. M. (2001).** The peroxisome-proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99 (5): 2613-2618. doi: 10.1073/pnas.052707099.
- [260] **SHI, Y., et al. (2001).** Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev*. 15 (9): 1140-1151. doi: 10.1101/gad.871201.
- [261] **SHIEKHATTAR, R., et al. (1995).** Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. *Nature*. 374 (6519): 283-287. doi: 10.1038/374283a0.
- [262] **SIMS, R. J. 3RD, BELOTSEKOVSKAYA, R. and REINBERG, D. (2004).** Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*. 18 (20): 2437-2468. doi: 10.1011/gad.1235904
- [263] **SINGH, B. N. and HAMPSEY, M. (2007).** A transcription-independent role for TFIIH in gene looping. *Mol Cell*. 27 (5): 806-816. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.013.
- [264] **SOUTOURINA, J. (2018).** Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 19 (4): 262-274. doi: 10.1038/nrm.2017.115.
- [265] **SPENCER, T. E., et al. (1997).** Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*. 389 (6647): 194-198. doi: 10.1038/38304.
- [266] **SUN, Z. W. and ALLIS, C. D. (2002).** Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*. 418 (6893): 104-108. doi: 10.1038/nature00883.
- [267] **SUN, Z., et al. (2013).** Deacetylase-independent function of HDAC3 in transcription and metabolism requires nuclear receptor corepressor. *Mol Cell*. 52 (6): 769-782. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.022.
- [268] **TAKAHASHI, H., et al. (2011).** Human mediator subunit 26 functions as a docking site for transcription elongation factors. *Cell*. 146 (1): 92-104. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.005.
- [269] **TAN, M. J., et al. (2012).** Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer. *Mol Cancer Res*. 10 (6): 677-688. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0519.
- [270] **TAN, N. S., et al. (2004).** Critical roles of the nuclear receptor PPAR β (peroxisome-proliferator-activated receptor β) in skin wound healing. *Biochem Soc Trans*. 32 (Pt1): 97-102. doi: 10.1042/bst0320097.
- [271] **TAN-WONG, S. M., et al. (2008).** Dynamic interactions between the promoter and terminator regions of the mammalian BRCA1 gene. *Proc Natl Sci USA*. 105 (13): 5160-5165. doi: 10.1073/pnas.0801048105.
- [272] **TANTALE, K., et al. (2016).** A single-molecule view of transcription reveals convoys of RNA polymerases and multi-scale bursting. *Nat Commun*. 7: 12248. doi: 10.1038/ncomms12248.
- [273] **TATE, C. G. (2012).** A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends Biochem Sci*. 37 (9): 343-352. doi: 10.1016/j.tibs.2012.06.003.
- [274] **TIEN, E. S., HANNON, D. B., THOMPSON, J. T. and VANDEN HEUVEL, J. P. (2006).** Examination of Ligand-Dependent Coactivator Recruitment by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha (PPARalpha). *PPAR Res* 2006: 69612. doi: 10.1155/PPAR/2006/69612.

- [275] THERMO SCIENTIFIC, Inc. (o. J.). Product Information: Thermo Scientific Absolute qPCR SYBR Green Mix. Rev. 5.
- [276] THOMAS, M. C. and CHIANG, C. M. (2006). The general transcription machinery and general co-factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 41 (3): 105-178. doi: 10.1018/10409230600648736.
- [277] THOMPSON, C. M., et al. (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell.* 73 (7): 1361-1375. doi: 10.1016/0092-8674(93)90362-T.
- [278] THOMPSON, P. R., et al. (2004). Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol.* 11 (4): 308-315. doi: 10.1038/nsmb740.
- [279] TOTH, P. M., et al. (2016). Design and synthesis of highly active peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ inverse agonists with prolonged cellular activity. *ChemMedChem.* 11 (5): 488-496. doi: 10.1002/cmdc.201500594.
- [280] TÓTH-PETRÓCZY, A., et al. (2008). Malleable machines in transcription regulation: the Mediator complex. *PLoS Comput Biol.* 4 (12): e1000243. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000243.
- [281] TSAI, F. T. F. and SIGLER, P. B. (2000). Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J.* 19 (1): 25-36. doi: 10.1093/emboj/19.1.25.
- [282] TSAI, K.-L., et al. (2013). A conserved Mediator-CDK8 kinase module association regulates Mediator-RNA polymerase II interaction. *Nat Struct Mol Biol.* 20 (5): 611-619. doi: 10.1038/nsmb.2549.
- [283] TSAI, K.-L., et al. (2014). Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional Mediator complex. *Cell.* 157 (6): 1430-1444. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.015.
- [284] UPPENBERG, J., et al. (1998). Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ . *J Biol Chem.* 273 (47): 31108-31112. doi: 10.1074/jbc.273.47.31108.
- [285] UTHE, H., VANSELOW, J. T. and SCHLOSSER, A. (2017). Proteomic analysis of the Mediator complex interactome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep.* 7: 43584. doi: 10.1038/srep43584.
- [286] VAN GINDERACHTER, J. A., et al. (2008). Macrophages, PPARs, and Cancer. *PPAR Res* 2008. 2008: 169414. doi: 10.1155/2008/169414.
- [287] VARNAT, F., et al. (2006). PPAR β/δ regulates Paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway. *Gastroenterology.* 131 (2): 538-553. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.004.
- [288] VISWAKARMA, N., et al. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res* 2010. 2010 pii: 250126. doi: 10.1155/2010/250126. 250126.
- [289] VOORHOEVE, O. M. and AGAMI, R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human *INK4A* locus. *Cancer Cell.* 4 (4): 311-319. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00223-X.
- [290] WANG, A. H., et al. (1999). HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol.* 19 (11): 7816-7827. doi: 10.1128/mcb.19.11.7816.
- [291] WANG, C., et al. (2011). Acetylation and nuclear receptor action. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 123 (3-5): 91-100. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.12.003.

- [292] **WANG, Y., FAIRLEY, J. A. and ROBERTS, S. G. (2010).** Phosphorylation of TFIIB links transcription initiation and termination. *Curr Biol.* 20 (6): 548-553. doi: 10.1016/j.cub.2010.01.052.
- [293] **WARFIELD, L., et al. (2017).** Transcription of nearly all yeast RNA polymerase II-transcribed genes is dependent on transcription factor TFIID. *Mol Cell.* 68 (1): 118-129.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.014.
- [294] **WÄRNMARK, A., et al. (2003).** Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 17 (10): 1901-1909. doi: 10.1210/me.2002-0384.
- [295] **WATSON, P. J., FAIRALL, L. and SCHWABE, J. W. (2012).** Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. *Mol Cell Endocrinol.* 348 (2): 440-449. doi: 10.1016/j.mce.2011.08.033.
- [296] **WEBB, P., et al. (2000).** The nuclear receptor corepressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs). *Mol Endocrinol.* 14 (12): 1976-1985. doi: 10.1210/mend.14.12.0566.
- [297] **WEISS, S. B. and GLADSTONE L. (1959).** A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid. *J Am Chem Soc.* 81 (15): 4118-4119. doi: 10.1021/ja01524a087.
- [298] **WEISSMAN, J. D., HOWCROFT, T. K. and SINGER, D. S. (2000).** TAF_{II}250-independent transcription can be conferred on a TAF_{II}250-dependent basal promoter by upstream activators. *J Biol Chem.* 275 (14): 10160-10167. doi: 10.1074/jbc.275.14.10160.
- [299] **WEN, Y. and SHATKIN, A. J. (1999).** Transcription elongation factor hSPT15 stimulates mRNA capping. *Genes Dev.* 13 (14): 1774-1779. doi: 10.1101/gad.13.14.1774.
- [300] **WERMAN, A., et al. (1997).** Ligand-independent activation domain in the N Terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 272 (32): 20230-20235. doi: 10.1074/jbc.272.32.20230.
- [301] **WESTERGAARD, M., et al. (2003).** Expression and localization of peroxisome proliferator-activated receptors and nuclear factor κ B in normal and lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 121 (5): 1104-1117. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12536.x.
- [302] **WICKENS, M. and STEPHENSON, P. (1984).** Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation. *Science.* 226 (4678): 1045-1051. doi: 10.1126/science.6208611.
- [303] **WONG, C.-W. and PRIVALSKY, M. L. (1998).** Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol Cell Biol.* 18 (9): 5500-5510. doi: 10.1128/MCB.18.9.5500.
- [304] **WONG, K. H., JIN, Y. and STRUHL, K. (2014).** TFIIF phosphorylation of the Pol II CTD stimulates mediator dissociation for the preinitiation complex and promoter escape. *Mol Cell.* 54 (4): 601-612. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.024.
- [305] **Xu, H. E., et al. (1999).** Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell.* 3 (3): 397-403. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80467-0.
- [306] **Xu, H. E., et al. (2001).** Structural determinants of ligand binding selectivity between the

- peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98 (24): 13919-13924. doi: 10.1073/pnas.241410198.
- [307] **Xu, H. E., et al. (2002)**. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature*. 415 (6873): 813-817. doi: 10.1038/415813a.
- [308] **Xu, J., Wu, R.-C. and O'MALLEY, B. W. (2009)**. Normal and Cancer-related functions of the p160 steroid receptor coactivator (SRC) family. *Nat Rev Cancer*. 9 (9): 615-630. doi: 10.1038/nrc2695.
- [309] **YAMADA, T., et al. (2006)**. P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell*. 21 (2): 227-237. doi: 10.1016/j.molcel.2005.11.024.
- [310] **YAMAGUCHI, Y., et al. (2002)**. Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol*. 22 (9): 2918-2927. doi: 10.1128/MCB.22.9.2918-2927.2002.
- [311] **YOON, H.-G., et al. (2003)**. Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J*. 22 (6): 1336-1346. doi: 10.1093/emboj/cdg120.
- [312] **You, S.-H., et al. (2013)**. Nuclear receptor co-repressors are required for the histone-deacetylase activity of HDAC3 *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol*. 20 (2): 182-187. doi: 10.1038/nsmb.2476.
- [313] **Yu, C., et al. (2015)**. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 16 (2): 142-147. doi: 10.1016/j.stem.2015.01.003.
- [314] **Yu, F., THIESEN, J. and STRÄTLING, W. H. (2000)**. Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res*. 28 (10): 2201-2206. doi: 10.1093/nar/18.10.2201.
- [315] **Yu, J., et al. (2003)**. A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J*. 22 (13): 3402-3410. doi: 10.1093/emboj/cdg326.
- [316] **YU, L. and JEARAWIRIYAPAISARN, N., et al. (2018)**. BAP1 regulation of the key adaptor protein NCoR1 is critical for γ -globin gene repression. *Genes Dev*. 32 (23-24): 1537-1549. doi: 10.1101/gad.318436.118.
- [317] **Yu, S. and REDDY, J. K. (2007)**. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1771 (8): 936-951. doi: 10.1016/j.bbailip.2007.01.008.
- [318] **YUDKOVSKY, N., RANISH, J. A. and HAHN, S. (2000)**. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*. 408 (6809): 225-229. doi: 10.1038/35041603.
- [319] **ZAMIR, I., ZHANG, J. and LAZAR, M. A. (1997)**. Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes Dev*. 11 (7): 835-846. doi: 10.1101/gad.11.7.835.
- [320] **ZHANG, C. and BURTON, Z. F. (2004)**. Transcription factors IIF and IIS and nucleoside triphosphate substrates as dynamic probes of the human RNA polymerase II mechanism. *J Mol Biol*. 342 (4): 1085-1099. doi: 10.1016/j.jmb.2004.07.070.
- [321] **ZHANG, J., et al. (2002)**. The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the

JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol Cell*. 9 (3): 611-623.
doi: 10.1016/S1097-2765(02)00468-9.

- [322] **ZHANG, X., et al. (2005)**. MED1/TRAP220 exists predominantly in a TRAP/Mediator subpopulation enriched in RNA polymerase II and is required for ER-mediated transcription. *Mol Cell*. 19 (1): 89-100. doi: 10.1016/j.molcel.2005.05.015.
- [323] **ZHONG, H., VOLL, R. E. and GOSH, S. (1998)**. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*. 1 (5): 661-671. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80066-0.
- [324] **ZOETE, V., GROSDIDIER, A. and MICHIELIN, O. (2007)**. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interaction with regulators. *Biochim Biophys Acta*. 1771 (8): 915-925. doi: 10.1016/j.bbalip.2007.01.007.

6.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DNA-Bindungstypen der Kernrezeptor-Superfamilie.	2
ABBILDUNG 2: Proteinstruktur von PPAR β/δ	4
ABBILDUNG 3: Kristallstruktur der PPAR β/δ -LBD mit dem Agonisten GW0742.	6
ABBILDUNG 4: DNA-Bindung der PPARs mit ihrem Dimerisierungspartner RXR.	7
ABBILDUNG 5: Konformationsänderung der Helix 12 in Abhängigkeit des Ligandentyps.	8
ABBILDUNG 6: Schema der transkriptionellen Regulation durch PPAR β/δ (Typ II Zielgene).	11
ABBILDUNG 7: Topologie des <i>ANGPTL4</i> -Locus und bekannte regulative Elemente.	13
ABBILDUNG 8: Schema der Domänenstruktur von NCoR bzw. SMRT.	15
ABBILDUNG 9: Interaktion der Kernkomponenten von SMRT-Komplexen.	16
ABBILDUNG 10: TFIID-Bindung an Kernpromotor-Elemente.	21
ABBILDUNG 11: Struktur des TBP-TATA (A) bzw. des TBP-TFIIA-TFIIB-DNA Komplexes (B).	22
ABBILDUNG 12: Architektur des humanen Core-PolIII-Initiationskomplexes.	23
ABBILDUNG 13: Funktion von TFIIF in der Promotoröffnung.	25
ABBILDUNG 14: Unterstützung der Selektion des Transkriptionsstarts durch TFIIB.	26
ABBILDUNG 15: Transition von abortiver Initiation zu produktiver Initiation.	27
ABBILDUNG 16: Phosphorylierungszustände der Pol II CTD im Transkriptionszyklus.	29
ABBILDUNG 17: Modulare Architektur des Mediator-Komplexes.	34
ABBILDUNG 18: Modell der transienten Interaktion des Kern-Mediators mit dem PIC (Hefe).	37
ABBILDUNG 19: Modell der Mediator-Funktionen in frühen Schritten der Transkription.	39
ABBILDUNG 20: Klonierungsstrategie PPAR β/δ -NCoR/SMRT-Fusionskonstrukte in pMSCVbsd.	63
ABBILDUNG 21: Klonierungsstrategie dnNCoR1 in vier Vektoren.	64
ABBILDUNG 22: Aufbau des <i>SemiDry</i> -Blot Systems.	81
ABBILDUNG 23: Neubauer Zählkammer.	87
ABBILDUNG 24: RT-qPCR, PPAR β/δ -Ligandenresponsivität in MDA-MB231- <i>luc2</i> und Caki-1.	95
ABBILDUNG 25: <i>Scanning</i> ChIP-qPCR, Untersuchung der RNA-Polymerase II Bindungsprofile am <i>ANGPTL4</i> Locus. .	97
ABBILDUNG 26: <i>Scanning</i> ChIP-qPCR, Vergleich der Auswirkungen von PT-S264 und von bekannten Transkriptionsinhibitoren auf das Bindungsprofil der RNA-Polymerase II.	98
ABBILDUNG 27: <i>Scanning</i> ChIP-qPCR, Untersuchung der Phosphorylierung von Serin 2 und 5 der RNA-Polymerase II RPB1 CTD- <i>Repeats</i>	99

ABBILDUNG 28: ChIP-qPCR, Überprüfung der Rekrutierung von GTFs zum <i>ANGPTL4</i> Locus.....	101
ABBILDUNG 29: ChIP-qPCR, Überprüfung der Rekrutierung von Mediator-Untereinheiten zum <i>ANGPTL4</i> Locus...	102
ABBILDUNG 30: ChIP-qPCR, Rekrutierung von NCoR an die <i>ANGPTL4</i> und <i>PDK4</i> PPRES in Anwesenheit des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264.	106
ABBILDUNG 31: ChIP-qPCR, Rekrutierung von Untereinheiten der NCoR/SMRT-Komplexe in Anwesenheit des inversen PPAR β/δ Agonisten PT-S264.....	107
ABBILDUNG 32: Charakterisierung des MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 <i>PPARD</i> KO Klons.....	108
ABBILDUNG 33: Sequenzierung des MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 <i>PPARD</i> KO Klons in den Bereichen der Erkennungssequenzen der gRNAs.	109
ABBILDUNG 34: Rekonstitution des MDA-MB231- <i>luc2</i> 2B3 <i>PPARD</i> KO Klons.....	111
ABBILDUNG 35: Sekundärstrukturbereiche der PPARs.	114
ABBILDUNG 36: Graphische Zusammenfassung des retroviralen Rekonstitutionsscreens mit 80 PPAR β/δ Mutanten.	117
ABBILDUNG 37: Venn-Diagramm, Auswirkungen von 80 untersuchten Mutationen auf die transkriptionelle Regulation von <i>ANGPTL4</i> durch PPAR β/δ	119
ABBILDUNG 38: Schematische Übersicht über die Position einiger Mutationen.....	120
ABBILDUNG 39: Ligandenabhängige Konformationsänderung der Helix 12.	121
ABBILDUNG 40: Sequenz des PPAR β/δ C-Terminus.	122
ABBILDUNG 41: RT-qPCR, Auswirkungen der Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression auf die transkriptionelle Regulation von <i>ANGPTL4</i>	126
ABBILDUNG 42: ChIP-qPCR, Rekrutierung von NCoR und SMRT in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression.....	128
ABBILDUNG 43: ChIP-qPCR, Rekrutierung von HDAC3 in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression.	129
ABBILDUNG 44: ChIP-qPCR, Rekrutierung der RNA-Polymerase II in den Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression.....	130
ABBILDUNG 45: RT-qPCR, Sensitivität der PT-S264 vermittelten Repression gegenüber HDAC-Inhibitoren, MDA-MB-231- <i>luc2</i> und 2B3 <i>PPARD</i> KO.	132
ABBILDUNG 46: RT-qPCR, Sensitivität der PT-S264 vermittelten Repression gegenüber HDAC-Inhibitoren, MDA-MB-231- <i>luc2</i> 2B3 <i>PPARD</i> KO transduziert mit PPAR β/δ cDNAs.....	133
ABBILDUNG 47: CRISPR/Cas9 zur Generierung eines <i>NCOR1</i> Knockout.....	135
ABBILDUNG 48: Versuch der Expression eines dominant-negativen NCoR1-Fragments.	137
ABBILDUNG 49: Sequenz-Alignment der RCORs und NCoRs.	138

ABBILDUNG 50: Expression von PPAR β / δ -NCoR/SMRT Fusionskonstrukten.....	139
ABBILDUNG 51: Western Blot, Anstieg des PPAR β / δ -Proteinlevels im zeitlichen Verlauf nach der retroviralen Rekonstitution von 2B3 <i>PPARD</i> KO Zellen.....	151
ABBILDUNG 52: Die AF2-Helix wird abhängig vom gebundenen Liganden repositioniert.....	154
ABBILDUNG 53: Rolle der Aminosäure L429 für die ligandeninduzierte Regulation.....	156
ABBILDUNG 54: Rolle der Aminosäuren L432 und L433 bei der aktiven Konformation.	157
ABBILDUNG 55: Störung der aktiven Konformation durch die Mutationen H430K und V254R.....	158
ABBILDUNG 56: Rolle der Aminosäuren E435 und Y437 für die ligandeninduzierte Regulation.	159
ABBILDUNG 57: Sterische Behinderung der Co-Regulator Bindung und Störung der hydrophoben Interaktionsoberfläche bei den Mutanten V257R, T261R und V279R.....	161
ABBILDUNG 58: Stabilisierung der aktiven Konformation durch D439 und K283.....	162
ABBILDUNG 59: Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen F324, I420 und den Liganden.....	163
ABBILDUNG 60: Vergleich der Positionen der Helix 12 in PPAR γ F360L mit den PPAR α -Strukturen.....	163
ABBILDUNG 61: Sterische Behinderung der Ligandenbindung bei der Mutante H413W.	164
ABBILDUNG 62: Die Aminosäure I327 ragt mit ihrem hydrophoben Rest in die Ligandenbindungstasche hinein...	165
ABBILDUNG 63: Wechselwirkungen zwischen R321, E240 und E424.	166
ABBILDUNG 64: Stabilisierung der Tertiärstruktur durch R314 und mögliche Auswirkungen der Mutationen T427I und T427D.....	168
ABBILDUNG 65: Vergleich der C-Termini der drei PPAR-Subtypen.	169

6.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: Klassen der Kernrezeptor-Superfamilie.	1
TABELLE 2: PPAR-Liganden zur Behandlung von Zellen.	46
TABELLE 3: weitere Stoffe zur Behandlung von Zellen.	46
TABELLE 4: Verwendete Selektionsantibiotika.	51
TABELLE 5: ChIP-qPCR Antikörper.	54
TABELLE 6: Western Blot Antikörper.	55
TABELLE 7: ChIP-qPCR Primer.	56
TABELLE 8: Mutagenese Primer pMSCVbsd-PPARD.	56
TABELLE 9: Sequenzierungsprimer.	57
TABELLE 10: RT-qPCR Primer.	58
TABELLE 11: Primer für <i>in vitro</i> RNP-Test.	58
TABELLE 12: Verwendete Zelllinien.	60
TABELLE 13: Q5®-PCR Reaktionsansatz.	66
TABELLE 14: Temperaturprogramm der Q5®-PCR.	66
TABELLE 15: Reaktionsansatz Q5® <i>Site-directed Mutagenesis</i> PCR.	67
TABELLE 16: Temperaturprogramm Q5® <i>Site-directed Mutagenesis</i> PCR.	67
TABELLE 17: Zusammensetzung KLD Reaktionsansatz.	68
TABELLE 18: Reaktionsansatz eines Restriktionsverdaus.	69
TABELLE 19: Reaktionsansatz für eine Ligationsreaktion.	71
TABELLE 20: Temperaturprogramm der Kolonie-PCR.	73
TABELLE 21: Temperaturprogramm der RT-qPCR.	77
TABELLE 22: RT-qPCR Reaktionsansatz pro well einer 96-well Platte.	78
TABELLE 23: ChIP-qPCR Reaktionsansatz pro well einer 96-well Platte.	83
TABELLE 24: Zusammensetzung eines crRNA:tracrRNA Hybridisierungsansatzes.	90
TABELLE 25: Komponenten für die Bildung des RNP-Komplexes, 24-well.	90
TABELLE 26: Komponenten für die Bildung des RNP-Komplexes im <i>in vitro</i> RNP-Test.	92
TABELLE 27: RIME ChIP-MS Analyse, PPARβ/δ-Interaktoren in Anwesenheit von PT-S264 bzw. L165,041.	104
TABELLE 28: Screen von 80 PPARβ/δ Mutanten auf eine Beeinträchtigung der Ligandenresponsivität.	116
TABELLE 29: Zusammenfassung des retroviralen Rekonstitutionsscreens mit 80 PPARβ/δ Mutanten.	118

6.4 Abkürzungsverzeichnis

A Präfixe

Abkürzung	Vorsilbe	Faktor
M	Mega-	10^6
k	Kilo-	10^3
c	Centi-	10^{-2}
m	Milli-	10^{-3}
μ	Mikro-	10^{-6}
n	Nano-	10^{-9}
p	Pico-	10^{-12}

B Einheiten, physikalische Größen etc.

%	Prozent (pro 100)
A	Ampere
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	mol/l (molar)
min	Minute(n)
mol	Mol
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
U	Unit (Einheit der jeweiligen Enzymaktivität)
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
W	Watt
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
°C	Grad Celsius
(x) g	$9,81 \text{ ms}^{-2}$, Erdbeschleunigung

C Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Name	Abkürzung	Symbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

D Methoden

ChIP-MS	Chromatin-Immunpräzipitation gefolgt von einer Massenspektrometrie
ChIP-qPCR	Chromatin-Immunpräzipitation gefolgt von einer quantitativen PCR
ChIP-Seq	Chromatin-Immunpräzipitation gefolgt von einer Sequenzierung
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
GST-Pulldown	Glutathion S-Transferase Pulldown
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)

RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative PCR
RIME	<i>Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins</i>
RNAi	RNA-Interferenz

E Organismen, Gene, Proteine, Proteindomänen und andere Biomoleküle

A	Adenin
ABCA1	<i>ATP-binding cassette subfamily A member 1</i>
AF-1/ AF-2	Aktivierungsfunktion 1/ 2
ANGPTL4	<i>Angiopoietin-like 4</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BRD4	<i>Bromodomain-containing Protein 4</i>
BSA	bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
CAK-Komplex	<i>CDK-activating Kinase</i> Komplex
CARM1	<i>Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1</i>
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9
CBP	CREB-bindendes Protein
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CF1	<i>Cleavage Factor 1</i>
CMV	Cytomegalovirus
CoRNR-Box	<i>Co-Repressor Nuclear Receptor Box</i>
CPF	<i>Cleavage and polyadenylation factor</i>
CPSF	<i>Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor</i>
CPT1A	Carnitinpalmitoyltransferase 1 α
CREB	<i>cAMP Reponse Element-binding Protein</i>
CstF	<i>Cleavage Stimulation Factor</i>
CTD	C-terminale Domäne
CTE	C-terminale Extension
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
DAD	Deacetylase-aktivierende Domäne
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DR1-Element	<i>Direct Repeat</i> mit einem <i>Spacer</i> -Nukleotid (Sequenzmotiv der DNA)

DRIP	<i>Vitamin D Receptor-interacting Protein</i>
DSIF	<i>DRB Sensitivity-inducing Factor</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ecoR	„Zelllinie exprimiert den murinen ecotropen Rezeptor Slc7a1“
EEC	<i>Early Elongating Complex</i>
FCP1	TFIIF-assoziierte CTD Phosphatase 1
FIAF	<i>Fasting-induced Adipocyte Factor</i>
G	Guanin
GPS2	<i>G-Protein Pathway Suppressor 2</i>
gRNA	<i>guideRNA</i>
GST	Glutathion S-Transferase
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	humane embryonale Nierenzellen (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
HID	Histon-Interaktionsdomäne
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IDR	intrinsisch ungeordnete Region
IgG	Immunglobulin G
IR	<i>Inverted Repeat</i>
ITC	<i>Initially Transcribing Complex</i>
KAT	Lysin-Acetyltransferase
KDAC	Lysin-Deacetylase
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MeCP2	<i>Methylated CpG binding Protein 2</i>
MEDxx	Mediator-Untereinheit xx
MSCV	<i>Murine Stem Cell Virus</i>
NCoA	<i>Nuclear Receptor Co-Activator</i>
NCoR	<i>Nuclear Receptor Co-Repressor</i>
NELF	<i>Negative Elongation Factor</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NTD	N-terminale Domäne
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>

PIC	Präinitiationskomplex (<i>Preinitiation Complex</i>)
PLIN2	Perilipin 2
PoI II	RNA-Polymerase II
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
PPRE	<i>Peroxisome Proliferator Response Element</i>
PRMT1	<i>Protein Arginine Methyltransferase 1</i>
P-TEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
RD	Repressionsdomäne
RE	<i>Response Element</i>
RIC	Reinitiationskomplex (<i>Reinitiation Complex</i>)
RID	Rezeptor-Interaktionsdomäne
(m)RNA	(messenger) <i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNA Pol II	RNA Polymerase II
RNP	Ribonukleoprotein
RPB1	<i>DNA-directed RNA polymerase II subunit 1</i>
RPL27	<i>Ribosomal Protein L27</i>
RXR	Retinoid X Receptor
SANT	Swi3-Ada2-NCoR-TFIIB (Proteindomäne)
SBE	SMAD-bindendes Element
SEC	<i>Super Elongation Complex</i>
Ser2-P/ Ser5-P	Phosphorylierung des 2. bzw. 5. Serins der RPB1 CTD-Repeats
SHARP	<i>SMRT and Histone Deacetylase-associated Repressor Protein</i>
SMRT	<i>Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptors</i>
SRC	<i>Steroid Receptor Coactivator</i>
T	Thymin
TAF	TBP-assoziiierter Faktor
TBL1	<i>Transducin β-like 1</i>
TBP	TATA-bindendes Protein
TFIIA	Transkriptionsfaktor A der RNA-Polymerase II
TFIIB	Transkriptionsfaktor B der RNA-Polymerase II
TFIID	Transkriptionsfaktor D der RNA-Polymerase II
TFIIE	Transkriptionsfaktor E der RNA-Polymerase II
TFIIF	Transkriptionsfaktor F der RNA-Polymerase II
TFIIH	Transkriptionsfaktor H der RNA-Polymerase II
TR	<i>Thyroid Receptor</i>
TRAP	<i>Thyroid Hormone Receptor-associated Protein</i>

TSS	Transkriptionsstartstelle
ZF	Zinkfinger

F Chemikalien, Lösungen und Medien

15-HETE	<i>15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AZT	Azidothymidin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
LB-Medium	Luria Broth-Medium
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	<i>Tris-buffered Saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TSA	Trichostatin A

G sonstige Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AG/ AK	Arbeitsgruppe/ Arbeitskreis
ATCC	American Type Culture Collection
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
et al.	<i>et alii</i> („und andere“)
fw	<i>forward</i> (vorwärts)
h	human (Mensch)

IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
kb	Kilobasen
KO	<i>Knockout</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information (USA)</i>
NEB	<i>New England BioLabs</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i> (DNA-Reparaturmechanismus)
NIH	<i>National Institutes of Health (USA)</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA Decay</i>
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (offenes Leseraster)
PDB ID	<i>Protein Data Bank</i> Identifikationsnummer
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
rv	<i>reverse</i> (rückwärts)
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i> (Online-Datenbank)
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

7 Anhang

7.1 Ergänzende Abbildungen

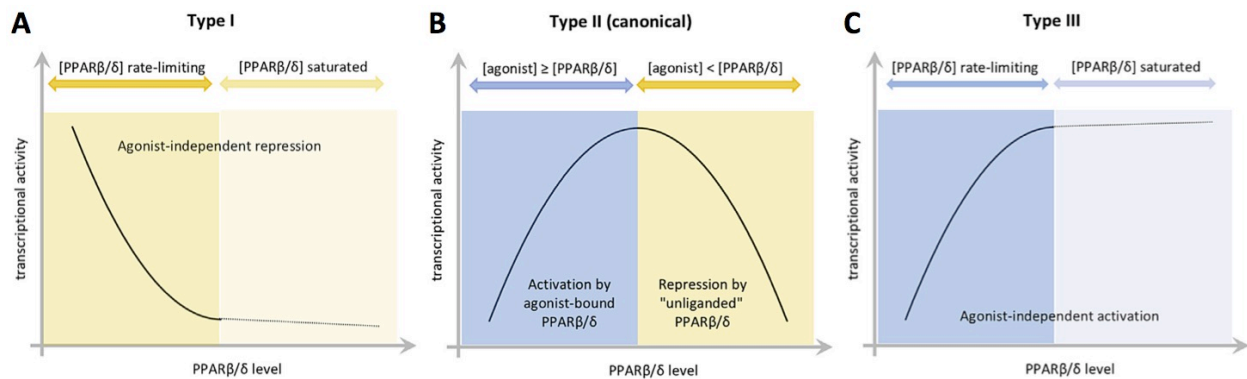


Abbildung Z1: Simulation von Effekten eines schwankenden PPARβ/δ Levels. Der Effekt eines schwankenden PPARβ/δ Levels auf die Transkription seiner Zielgene ist abhängig von der Verfügbarkeit von Liganden und dem Regulationstyp des betreffenden Zielgens. Aus Müller 2017 ^[191].

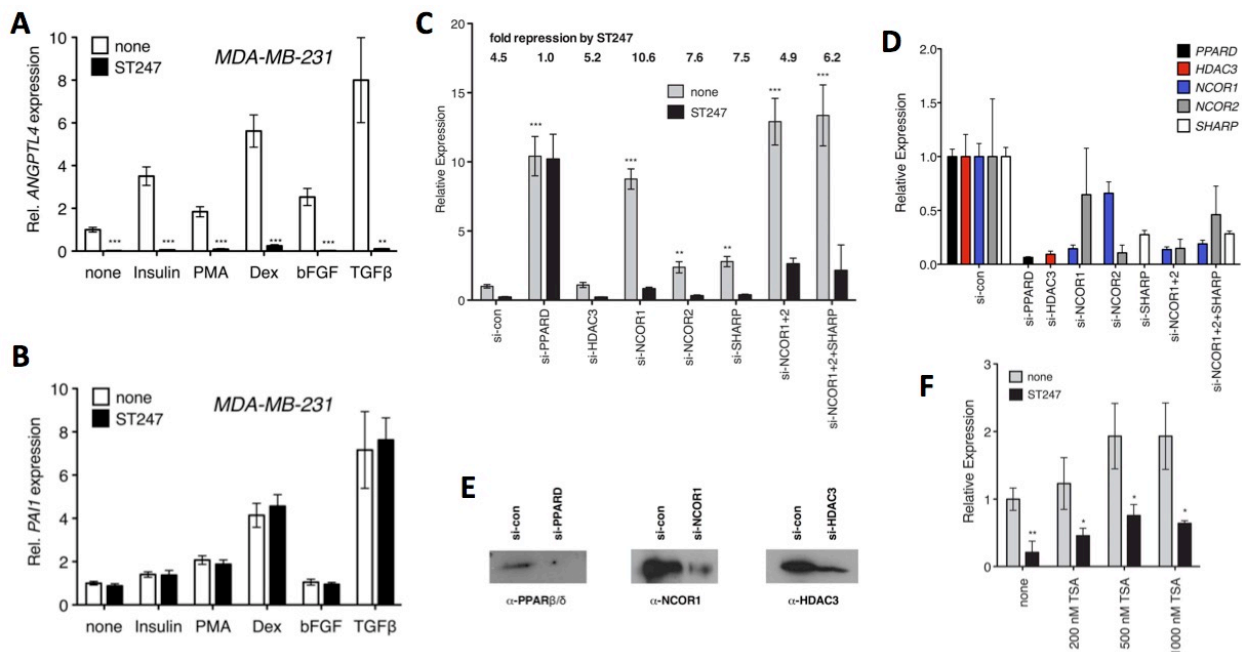


Abbildung Z2: Vorergebnisse aus Adhikary et al. 2013. A-B) Die Repression der *ANGPTL4*-Transkription durch den inversen PPARβ/δ Agonisten ST247 ist dominant gegenüber aktivierenden Stimuli wie Insulin, PMA, Dexamethason, bFGF und TGFβ. C) Der *Knockdown* von bekannten Co-Repressoren beeinträchtigt die basale Repression der *ANGPTL4* Transkription, aber nicht die Repression durch den inversen Agonisten ST247. D) Überprüfung der *Knockdowns* auf RNA-Ebene. E) Überprüfung der *Knockdowns* auf Protein-Ebene. F) Die Repression durch den inversen Agonisten ist nur teilweise TSA-sensitiv.

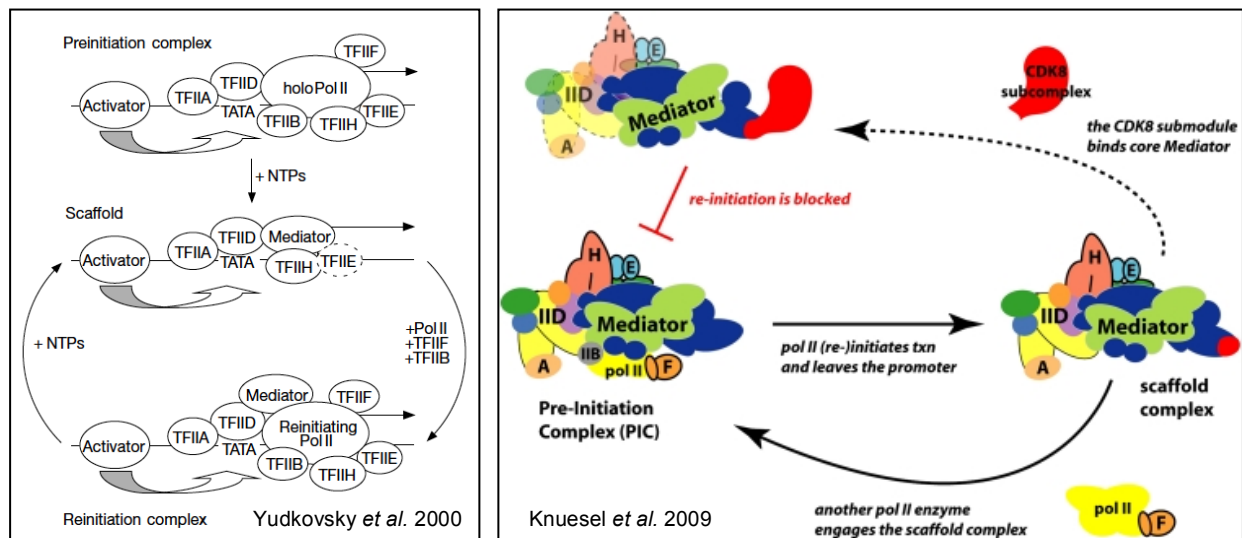


Abb. Z3: links: aus Yudkovsky, Ranish and Hahn 2000: „Reinitiation model. When NTPs are added to a pre-initiation complex, RNA Pol II initiates transcription. Whereas TFIIB and TFIIF dissociate from the promoter, activator, TFIID, TFIIA, TFIIF, TFIIE and Mediator are left behind in a scaffold complex. RNA Pol II, TFIIF and TFIIB then reassemble onto the scaffold to form a complex capable of reinitiating transcription. TFIIE is shown as being the least stable scaffold component.“ **rechts: aus Knuesel et al. 2009: „A model for transcriptional regulation by the CDK8 subcomplex.** Following PIC formation, pol II escapes the promoter to leave behind the scaffold complex (Yudkovsky et al. 2000). Based on our in vitro transcription and binding assays, the CDK8 subcomplex is capable of binding Mediator within the scaffold complex, whereas a fully assembled PIC appears impervious to submodule binding. Consequently, we hypothesize that Mediator undergoes a structural shift during the fully assembled PIC/ scaffold complex transition that exposes a surface capable of interacting with the CDK8 subcomplex. Yet Mediator remains competent to bind another pol II enzyme in this state, and doing so enables reinitiation from the scaffold complex. In the absence of CDK8 submodule binding, multiple rounds of activated transcription might occur with pol II cycling from the same PIC/ scaffold assembly. However, if the CDK8 submodule is present and competent for binding Mediator, reinitiation can be blocked upon its incorporation within the scaffold complex.“

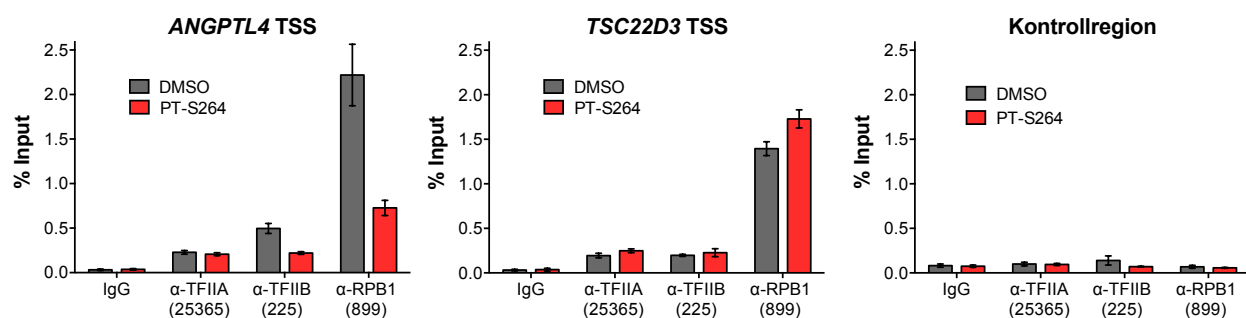


Abbildung Z4: ChIP-qPCR, Rekrutierung von GTFs und der RNA-Polymerase II RPB1. Caki-1 Zellen wurden für 30 Minuten mit 300 nM PT-S264 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Anschließend wurde eine ChIP mit Antikörpern gegen die GTFs TFIIA und TFIIB sowie die RNA-Polymerase II Untereinheit RPB1 durchgeführt. Die Anreicherungen am TSS des PPAR-Zielgens *ANGPTL4*, am TSS von *TSC22D3*, welches kein PPAR-Zielgen ist, und in einer Kontrollregion wurden mittels qPCR gemessen. Durchgeführt von T. Adhikary.

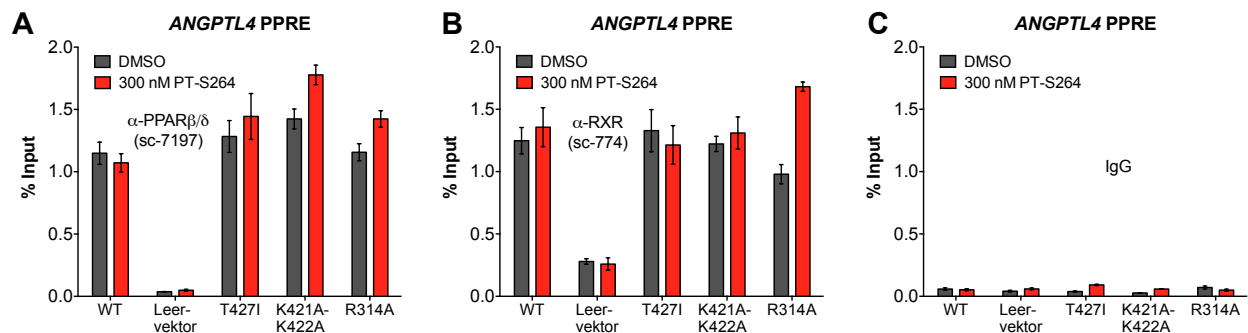


Abbildung Z5: ChIP-qPCR, Überprüfung der DNA-Bindung der PPAR β/δ -Mutanten mit einem Verlust der basalen Repression. MDA-MB231-*luc2* 2B3 *PPAR δ* KO Zellen mit Retroviren transduziert, die die angegebenen PPAR β/δ cDNAs tragen. Nach Ablauf der Selektion wurden die Zellen für 30 Minuten mit 300 nM PT-S264 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Anschließend wurde eine ChIP mit Antikörpern gegen PPAR β/δ (A) und seinen Heterodimerisierungspartner RXR (B) oder mit einem unspezifischen IgG-Pool (C) durchgeführt. Die Anreicherungen der PPRES des PPAR-Zielgens *ANGPTL4* wurde mittels qPCR gemessen. Durchgeführt von T. Adhikary.

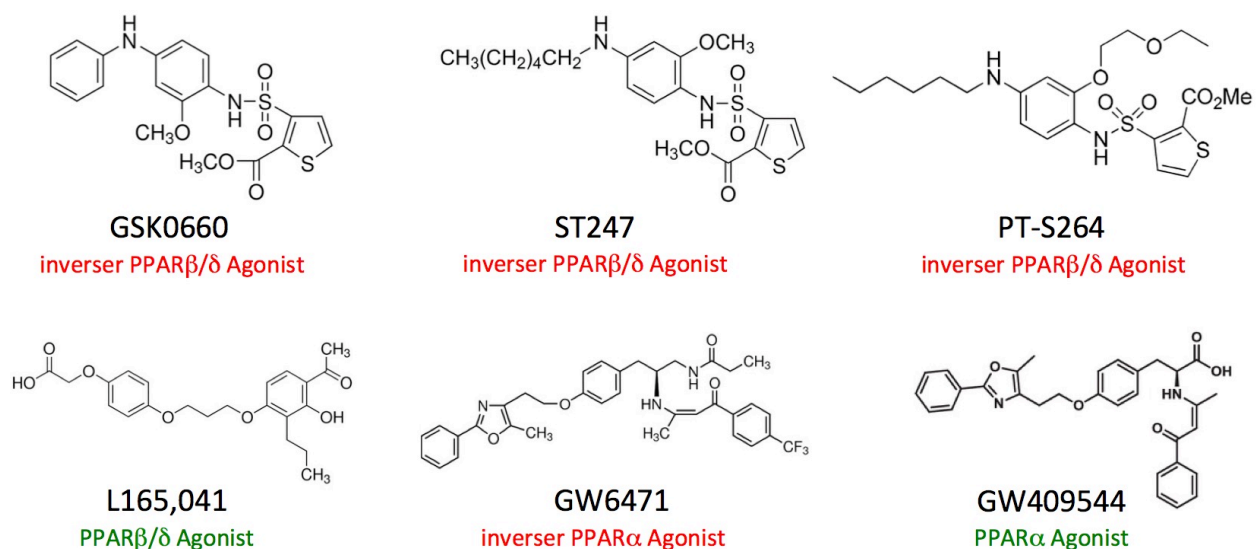


Abbildung Z6: Strukturen von PPAR-Liganden, die in dieser Arbeit für Experimente verwendet oder erwähnt wurden. Der inverse PPAR β/δ Agonist PT-S264 und der PPAR β/δ Agonist wurden in zahlreichen Experimenten in dieser Arbeit verwendet. GSK0660 und ST247 wurden lediglich erwähnt bzw. kommen in ergänzenden Abbildungen vor. Die PPAR α -Liganden GW6471 bzw. GW409544 sind in den für die Interpretation des funktionellen Screens herangezogenen Kristallstrukturen von PPAR α (PDB ID 1KKQ bzw. 1K7L) an den Rezeptor gebunden.

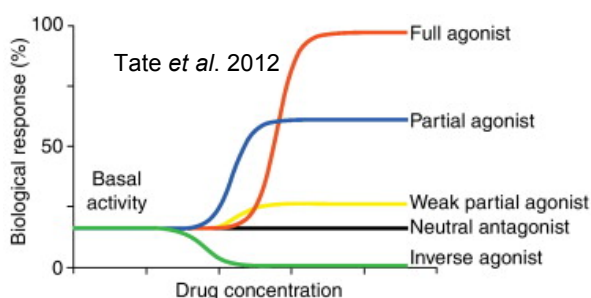


Abb. Z7: Pharmakologische Effekte verschiedener Liganden. Aus Tate *et al.* 2012^[273]

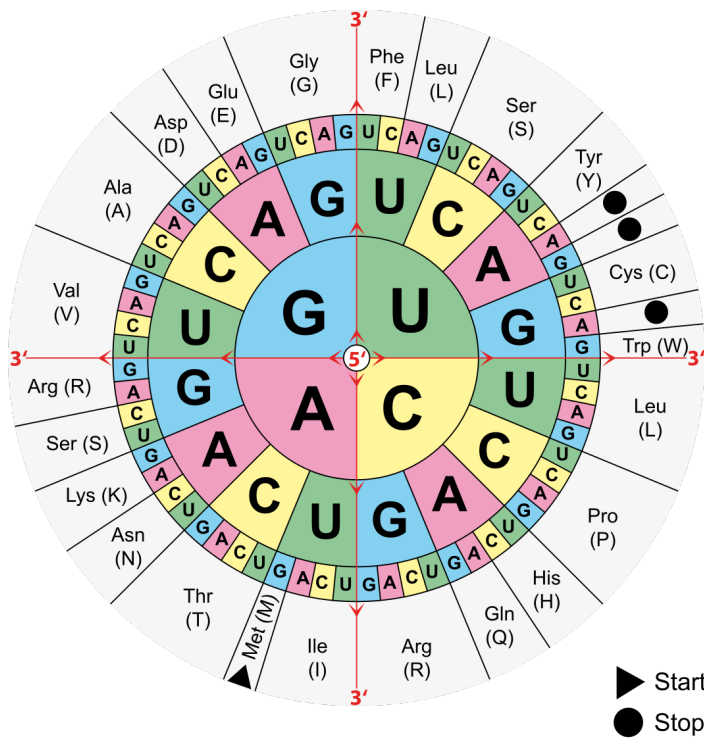


Abb. Z8: Code-Sonne. Anhand der Code-Sonne kann direkt abgelesen werden, für welche Aminosäure ein bestimmtes Codon kodiert. Aus: <https://de.wikipedia.org/wiki/Code-Sonne> [Stand: 25.06.2019]

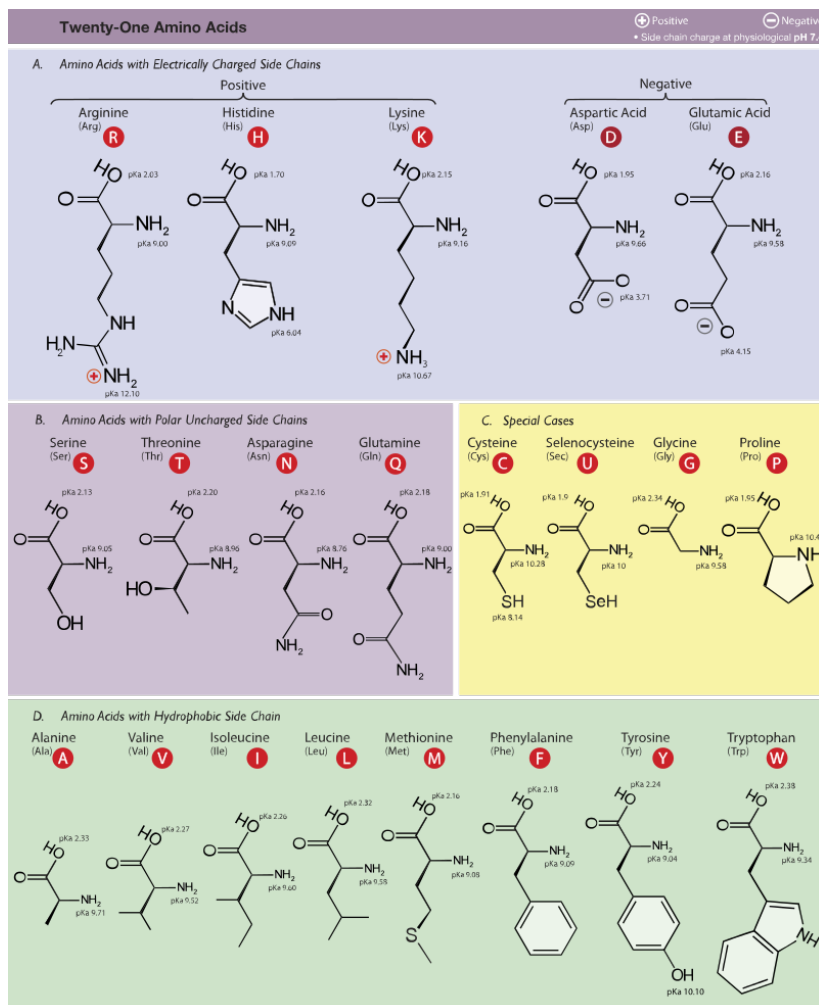


Abb. Z9: Strukturen der Aminosäuren und Gruppierung nach ihren Eigenschaften. Aus: https://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid [Stand: 25.06.2019]

7.2 Lebenslauf

7.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adhikary, Adamkiewicz, Agarwal, Arenz, Balzer-Geldsetzer, D. Bartsch, J.-W. Bartsch, **U.-M. Bauer**, S. Bauer, Bette, **Bieringer**, Bohlander, Böhm, Brandt, Braun, **Brehm**, Brendel, Buchholz, Burchert, Busch, Czubayko, Daut, **Diederich**, Dodel, Elsässer, Eming, Feuser, **Finkernagel**, **Fritz**, Garn, Greene, Greiner, Grgic, Grikschek, Grosse, Grzeschik, Hänze, Hertl, Heyd, Jacob, Jakob, Kakadia, Khan, Kinscherf, Koch, Konrad, Kösters, **Lauth**, Lieber, Lill, Lohoff, Maisner, Mandic, Meißner, Mernberger, Mühlenhoff, **Müller**, **Müller-Brüsselbach**, Oberthür, Oliver, Pankuweit, Parak, Pfestroff, Plant, Puccetti, Purvanov, **Reinartz**, Reiß, Ringer, Rohnlalter, Rust, Schmeck, Schieffer, Schlomann, Schratt, Schütz, Slater, Steinhoff, Steiniger, Stielow, **Stiewe**, Störchel, Strauer, **Suske**, Thümmeler, Timmesfeld, Timofeev, **Unger**, Völkel, Wang, **Wanzel**, Weirich, Weiß, Westermann, Worzfeld, **Wrocklage**, Zemlin

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, ein herzliches Dankeschön an die Personen zu richten, die mich während der letzten drei Jahre und insbesondere bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Till Adhikary für die Überlassung des sehr interessanten Promotionsthemas, die angenehme Zusammenarbeit, sowie die engagierte und kompetente Betreuung während der experimentellen Phase meiner Doktorarbeit und der Anfertigung dieser Dissertation. Neben konstruktiven wissenschaftlichen Gesprächen, waren mir die auflockernden Laborgespräche stets eine sehr große Hilfe, wenn es darum ging die Motivation und die Freude am Projekt trotz Rückschlägen aufrecht zu erhalten. Die gemeinsame Entwicklung neuer Ideen und Diskussionen über das Projekt haben mein wissenschaftliches Arbeiten sehr geprägt und bereichert.

Allen Kollegen des dritten Stockwerks des ZTI danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche Unterstützung untereinander, über die Grenzen von Arbeitsgruppen hinaus. An die AGs Diederich, Suske, Lauth, Pogge, Reinartz und Müller geht ein herzliches Dankeschön für die Kooperation und Unterstützung auf der Suche nach Rat und Reagenzien. Besonders hervorheben möchte ich meinen AG-Kollegen Bernhard Wilke und ihm für seine tatkräftige Unterstützung und Hilfe sowie wertvolle Tipps für die Laborarbeit danken. Wegen des angenehmen, harmonischen und oft auch humorvollen Arbeitsklimas fühlte ich mich jederzeit willkommen und es machte Freude das Projekt zu bearbeiten. Ebenfalls danken möchte ich Janina Kroll und Laura Zein, die mit viel Humor, Unterstützung, Aufmunterungen und ihrer eigenen Motivation dazu beitrugen, die etwas dunkleren Zeiten aufzuhellen und die Erfolgsmomente teilten. Während eurer Masterarbeit habt ihr den Labor-alltag sehr viel schöner gemacht.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, meinen Schwestern und engen Freunden, die mich jederzeit in allem unterstützen, was ich mir vorgenommen habe. Euer Verständnis, die Aufmunterungen und der Ausgleich, den ich in den letzten drei Jahren in der mit euch verbrachten Zeit gefunden habe, haben sehr zu meiner Ausdauer, Motivation und somit letztlich zum erfolgreichen Abschluss der Promotion beigetragen.

7.5 Veröffentlichungen

Im Rahmen der Anfertigung dieser Arbeit wurden wesentliche Teile daraus veröffentlicht:

Nathalie Legrand, Iris Nee, Clemens Bretscher, Bernhard Wilke, Philipp Toth, Svenja Zielke, Barbara Fritz, Wibke E. Diederich and Till Adhikary.

***ANGPTL4* repression by inverse agonists of peroxisome proliferator activated receptor β/δ (PPAR β/δ) through an HDAC-independent mechanism.**

Posterpräsentation, 4th TRR81 Symposium 2017

18.-20. September 2017, Egmond aan Zee, Niederlande

Nathalie Legrand, Iris Nee, Clemens Bretscher, Bernhard Wilke, Philipp Toth, Svenja Zielke, Barbara Fritz, Wibke Diederich and Till Adhikary.

PPAR β/δ regulates Mediator recruitment and reinitiation of *ANGPTL4* transcription.

Posterpräsentation, EMBL Conference: Transcription and Chromatin 2018

25.-28. August 2018, EMBL Heidelberg, Deutschland

Nathalie Legrand, Clemens Bretscher, Svenja Zielke, Bernhard Wilke, Michael Daude, Barbara Fritz, Wibke E. Diederich and Till Adhikary.

PPAR β/δ recruits NCoR and regulates transcription reinitiation.

(Juli 2019, revidierte Version eingereicht bei Nucleic Acids Research)

Mitwirkung an Publikationen der Arbeitsgruppe vor der Anfertigung dieser Arbeit:

SCHUMANN, T., et al. (2015). Deregulation of PPAR β/δ target genes in tumor-associated macrophages by fatty acid ligands in the ovarian cancer microenvironment. *Oncotarget*. 6 (15): 13416-13433. doi: 10.18632/oncotarget.3826.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung